

Université de Montréal

**Implication du facteur IKAROS dans la régulation des gènes
cibles de la voie NOTCH dans les cellules érythroïdes**

par

Maud Lemarié

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur
en Sciences Biomédicales option Médecine Expérimentale

Janvier 2019

© Maud Lemarié, 2019

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

Implication du facteur IKAROS dans la régulation des gènes cibles de la voie NOTCH dans les cellules érythroïdes

Présentée par :

Maud Lemarié

A été évaluée par le jury suivant :

Dre Trang Hoang, présidente-rapporteuse

Dr Eric Milot, directeur de recherche

Dr Christian Beauséjour, membre du jury

Dr Nicolas Pilon, examinateur externe

Dre Marie Trudel, représentante du doyen de l'Université

RESUME

IKAROS est un facteur de transcription majeur dans l'hématopoïèse qui agit en recrutant à la chromatine de nombreux partenaires décisifs dans le renouvellement cellulaire et l'engagement vers des lignages spécifiques. Il est notamment requis dans les cellules lymphoïdes pour réprimer les gènes cibles de la voie de signalisation NOTCH. IKAROS est aussi important dans le développement des cellules érythroïdes dans lesquelles il facilite le passage d'une globine fœtale à adulte chez l'embryon grâce au recrutement des complexes remodeleurs de la chromatine NuRD et BAF. En condition normale, la voie de signalisation NOTCH réprime la différenciation en cellules érythroïdes. Il est donc important que les gènes cibles de la voie NOTCH soient finement régulés afin d'amener une cellule progénitrice à se différencier en érythrocyte énucléé. Dans les cellules hématopoïétiques, incluant les cellules érythroïdes, IKAROS est un régulateur important du gène *Hes1*, cible effectrice majeure de la voie NOTCH. En effet, IKAROS participe activement à la répression du gène *Hes1*, permettant le développement des cellules érythroïdes. Nous avons donc émis l'hypothèse que dans ces cellules, IKAROS pourrait avoir une action plus généralisée sur le contrôle des gènes ciblés par NOTCH, comme observé dans les cellules lymphoïdes. Il pourrait ainsi agir en recrutant les complexes enzymatiques nécessaires à la régulation de ces gènes comme NuRD et BAF afin d'assurer le développement des cellules érythroïdes. Étant donné que la régulation des gènes est aussi dépendante du motif de méthylation de l'ADN, nous avons étendu notre questionnement à cet autre aspect de la régulation qu'IKAROS pourrait utiliser pour contrôler les gènes de la voie NOTCH. Pour ce faire, nous avons procédé à l'analyse bio-informatique d'un séquençage d'ARN de cellules érythroïdes murines préalablement réalisé au laboratoire afin d'en extraire les gènes régulés par IKAROS, mais aussi par

NOTCH. L'analyse nous a permis d'extraire deux motifs d'expression intéressants observés dans les cellules érythroïdes pour lesquels IKAROS réprime ou active des gènes qui sont normalement réceptifs à l'activation de la voie NOTCH. Parmi les gènes réprimés par IKAROS en sont ressortis les gènes cibles de NOTCH *Cdkn1a* (P21^{WAF1/CIP1}) et *Trp53* (TP53), dont l'expression augmente fortement quand IKAROS est muté et que NOTCH est actif. Parmi les gènes activés par IKAROS en sont ressortis les gènes cibles de NOTCH *Prdm16* et *Nrarp*, dont l'expression diminue fortement quand IKAROS est muté et que NOTCH est actif. IKAROS est donc un régulateur pouvant être répresseur, mais aussi activateur d'une multitude de gènes ciblés par NOTCH dans les cellules érythroïdes. Par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine, nous avons pu observer qu'IKAROS semblait toujours agir en partenariat avec le complexe NuRD et que la présence du complexe BAF était plutôt dépendante de la voie NOTCH. L'association IKAROS-NuRD semble servir de plateforme pour imposer un état de chromatine bivalente (avec co-présence de H3K4me3 et de H3K27me3) associée à une pause transcriptionnelle. Dans ce contexte, les éléments nécessaires à l'initiation de la transcription (présence de la marque H3K4me3) des gènes ciblés par NOTCH sont recrutés mais, l'élongation transcriptionnelle est affectée. L'état de chromatine bivalente peut être associé à l'activité des déméthylases de l'ADN Ten-Eleven-Translocation (TET) qui empêchent alors l'hyperméthylation de ces régions. Nos résultats démontrent qu'IKAROS peut utiliser la protéine TET1 pour réguler des gènes cibles de la voie NOTCH, en y formant l'hydroxyméthylcytosine (5-hmC). Celle-ci peut aussi marquer les régions de régulation génique caractérisées par une chromatine bivalente et une pause transcriptionnelle. Ces travaux décrivent IKAROS comme un facteur agissant de façons multiples dans la régulation des gènes cibles de NOTCH dans les cellules érythroïdes. Nous

proposons qu'IKAROS et son partenaire NuRD soient requis pour mettre en place un état de chromatine bivalente et de pause transcriptionnelle pour faciliter l'activation physiologique des gènes cibles de NOTCH lors de la signalisation. IKAROS peut ainsi prendre part à l'activation ou la répression de gènes cibles de NOTCH, tout en facilitant la déméthylation de l'ADN ainsi que le recrutement d'éléments transcriptionnels qui favorisent un état de pause transcriptionnelle. NOTCH ainsi que d'autres éléments de régulation sont alors requis pour induire l'activation ou la répression des gènes cibles.

Mots-clés: IKAROS; NuRD; TET1; NOTCH; P21^{WAF1/CIP1} ; Pause de la transcription

ABSTRACT

IKAROS is a critical transcription factor in hematopoiesis. It facilitates the chromatin binding of many important co-factors required for chromatin organization during cell renewal and lineage commitment. IKAROS is particularly important in lymphoid cells whereby it is involved in the repression of target genes of the NOTCH signaling pathway. IKAROS is also important in the development of other hematopoietic lineages, including the erythroid cells, in which it facilitates the passage of a fetal to adult globin in the embryo through the recruitment of the chromatin remodeling complexes NuRD and BAF. Under normal conditions, the NOTCH signaling pathway represses development of erythroid cells. It is therefore important to precisely understand how the NOTCH target genes are regulated during passage from hematopoietic progenitor to the enucleated circulating erythrocyte. IKAROS has been demonstrated to be an important regulator of *Hes1* gene expression in hematopoietic cells of different lineages. *Hes1* is the major effector target of the NOTCH pathway and IKAROS actively participates in its repression. In erythroid cells, the regulation of *Hes1* imposed by IKAROS is required for terminal differentiation. We therefore investigated the importance of IKAROS in the regulation of NOTCH-targeted genes in erythroid cells. The combined effect of the mutation of IKAROS with NOTCH signaling was particularly investigated in these cells. To define how IKAROS influences the regulation of NOTCH target genes, we performed the bioinformatics analysis of a RNA-sequencing performed in murine erythroid cells activated or not for NOTCH signaling and whereby IKAROS is absent. We identified genes influenced by IKAROS expression and by NOTCH, and defined the effect of the combination of the absence of IKAROS expression and NOTCH pathway activation.

Two particular expression patterns were identified and characterized the combined effect of the absence of IKAROS and NOTCH pathway activation in erythroid cells. Indeed, the absence of IKAROS either favors the overexpression of NOTCH target genes or prevents their response to NOTCH pathway activation. To understand how IKAROS could have an opposite effect on different NOTCH target genes we analysed the effect of IKAROS on their regulation. Among the genes repressed by IKAROS are the target genes of NOTCH *Cdkn1a* (encoding the P21^{WAF1/CIP1} protein) and *Trp53* (encoding the TP53 protein), whose expression increases strongly when IKAROS is mutated and the NOTCH pathway is activated. *Prdm16* and *Nrarp* are, instead, requiring IKAROS expression for their activation by NOTCH. The characterization of these NOTCH target genes suggests that IKAROS can work in partnership with the NuRD complex to influence the expression. The chromatin characterization of these genes led us to posit that the IKAROS-NuRD could act as a ‘platform’ to impose a bivalent chromatin organization associated with poised transcription. Then, the regulation imposed by IKAROS-NuRD would be required for the physiological activation of NOTCH targets upon external signaling. Finally, since in embryonic stem cells the Ten-Eleven Translocation (TET) enzymes are reported to be frequently associated to bivalent chromatin in order to prevent DNA hypermethylation, we assessed whether IKAROS could interact and ‘use’ TET enzymes to regulate NOTCH target genes. We determined that IKAROS can co-immunoprecipitate with the TET1 enzymes. We show that IKAROS influences both recruitment and activity of TET1 to different NOTCH target genes and favors the accumulation of hydroxymethylcytosine (5-hmC) to these genes. 5-hmC can be considered as a mark of transcriptional pausing/bivalence. Thus, these studies bring new information on the mechanism used by IKAROS to influence gene regulation in hematopoietic cells. Our results

suggest that IKAROS primary function is to organize a bivalent chromatin and to promote transcriptional pausing to multiple NOTCH target genes. IKAROS is required to set the epigenetic and promoter organization for rapid activation upon NOTCH signaling.

Key words: IKAROS; NuRD; TET1; NOTCH; P21^{WAF1/CIP1}; Transcriptional poising

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|--------------|
| Résumé..... | iii |
| Abstract..... | vi |
| Table des matières..... | ix |
| Liste des tableaux..... | xiii |
| Liste des figures..... | xiv |
| Liste des abréviations..... | xvi |
| PARTIE I : Introduction..... | 1 |
| 1.1. L'hématopoïèse..... | 2 |
| 1.1.1. Le développement myélo-érythroïde..... | 5 |
| 1.1.1.1. Facteurs impliqués dans le développement érythro-mégacaryocytaire..... | 6 |
| 1.1.1.2. Biologie des cellules érythroïdes..... | 7 |
| 1.2. Revue de littérature : IKAROS: From chromatin organization to transcriptional elongation control..... | 15 |
| Abstract..... | 16 |
| IKAROS family of factors and isoforms..... | 17 |
| IKAROS biology and malignancies..... | 18 |
| IKAROS interacting partners and transcriptional repression..... | 20 |
| IKAROS interacting partners and transcriptional activation..... | 23 |
| Conclusion..... | 25 |
| Acknowledgements..... | 26 |

| | |
|--|-----------|
| References..... | 27 |
| 1.3. Problématique..... | 38 |
| 1.4. Hypothèse d'étude..... | 42 |
| 1.5. Objectifs..... | 43 |
| 1.5.1. Objectif 1..... | 43 |
| 1.5.2. Objectif 2..... | 43 |
| PARTIE II : Matériels et Méthodes..... | 44 |
| 2.1. Modèles..... | 45 |
| 2.1.1. Souris..... | 45 |
| 2.1.1.1. Génotypage des foies fœtaux murins..... | 46 |
| 2.1.2. Lignée cellulaire MEL (Mouse ErythroLeukemia)..... | 48 |
| 2.2. Préparation et analyse protéique..... | 49 |
| 2.2.1. Extraction nucléaire..... | 49 |
| 2.2.2. Immunoprécipitation de protéines (IP)..... | 50 |
| 2.2.3. Western Blot (Immunobuvardage de type Western)..... | 51 |
| 2.3. Préparation et analyse génique..... | 52 |
| 2.3.1. Extraction de l'ARNm..... | 52 |
| 2.3.2. Transcription inverse..... | 53 |
| 2.3.3. PCR quantitative..... | 53 |
| 2.4. Immunoprécipitation de la chromatine..... | 55 |
| 2.4.1. Protocole classique..... | 55 |
| 2.4.2. Protocole adapté à la marque 5-hmC..... | 58 |

| | |
|---|-----|
| PARTIE III : Résultats | 62 |
| Article I : IKAROS is required for proper expression of NOTCH target genes upon external signaling | 63 |
| Abstract | 66 |
| Introduction | 66 |
| Materials and Methods | 71 |
| Results and Discussion | 75 |
| References | 93 |
| 3. Caractérisation du rôle du facteur IKAROS dans l'hydroxyméthylation des gènes cibles de la voie NOTCH | 171 |
| 3.1. Méthylation de l'ADN | 171 |
| 3.2. Notions de base sur l'hydroxyméthylation | 172 |
| 3.3. L'hydroxyméthylation dans les cellules souches embryonnaires et les progéniteurs érythroïdes | 175 |
| 3.4. Résultats | 179 |
| 3.4.1. IKAROS interagit avec la protéine TET1 dans les cellules érythroïdes des foies fœtaux murins et dans les cellules Mouse Erythro-Leukemia (MEL) | 179 |
| 3.4.2. IKAROS module les gènes <i>Hes1</i> , <i>Hey2</i> et <i>HeyL</i> de façon directe dans les cellules érythroïdes | 181 |
| 3.4.3. IKAROS régule le recrutement de la protéine TET1 et la présence de 5-hmC à la chromatine de <i>Hes1</i> , <i>Hey2</i> et <i>HeyL</i> | 182 |
| PARTIE IV : Discussion et Conclusion | 188 |
| 4.1. Discussion | 189 |

| | |
|--|-----|
| 4.1.1. Modèle érythroïde utilisé..... | 190 |
| 4.1.1.1. Souris..... | 190 |
| 4.1.1.2. Lignée de pro-érythroblastes G1E-ER4..... | 191 |
| 4.1.1.3. Lignée stromale OP9-DL1..... | 193 |
| 4.1.2. Notion de plateforme de recrutement IKAROS-NuRD..... | 193 |
| 4.1.3. IKAROS-NuRD dans un contexte de chromatine bivalente..... | 197 |
| 4.1.4. IKAROS recrute TET1 sur des gènes cibles de la voie NOTCH..... | 201 |
| 4.1.5. Effets biologiques dus à l'activation ectopique de NOTCH en absence d'IKAROS..... | 204 |
| 4.2. Conclusion..... | 208 |
| Bibliographie..... | 211 |

| | |
|---|------|
| Annexe I. Détermination des effets biologiques dus à la mutation d'IKAROS et l'activation ectopique de la voie NOTCH..... | xxiv |
|---|------|

| | |
|--|-------|
| Annexe II. Implication du facteur IKAROS dans le recrutement du PRC2 et de son activité associée dans la lignée cellulaire humaine K562..... | xxvii |
|--|-------|

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1. Amorces IK.3 utilisées pour la PCR du génotypage des foies fœtaux murins..... | 47 |
| Tableau 2. Paires d'amorces utilisées pour quantifier l'ARN par qPCR après transcription inverse..... | 55 |
| Tableau 3. Liste des anticorps utilisés avec provenance associée..... | 57 |
| Tableau 4. Paires d'amorces utilisées pour quantifier l'ADN par qPCR après expérience de ChIP..... | 58 |
| Tableau 5. Contenu des solutions utilisées pour l'expérience de ChIP..... | 61 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|-----|
| Figure 1. Sites de production des cellules hématopoïétiques..... | 3 |
| Figure 2. Différents modèles de différenciation des cellules hématopoïétiques..... | 4 |
| Figure 3. Développement des cellules érythroïdes..... | 8 |
| Figure 4. Production embryonnaire, fœtale et adulte de l'hémoglobine..... | 9 |
| Figure 5. Diagramme de Venn représentant les régions enrichies par NICD, IKAROS et RBPJ. | 39 |
| Figure 6. Implication du facteur IKAROS dans la régulation des gènes cibles de la voie NOTCH..... | 41 |
| Figure 7. Représentation schématique de l'extraction des cellules érythroïdes à partir de foie fœtal murin..... | 46 |
| Figure 8. Représentation d'un cycle de PCR : température et fonction associée..... | 48 |
| Figure 9. Exemple de gel d'agarose après sonication des échantillons pour l'expérience de ChIP..... | 56 |
| Figure 10. Cycle de méthylation/déméthylation active des cytosines..... | 173 |
| Figure 11. Quantification du contenu génomique en 5-hmC dans différents tissus et types cellulaires..... | 174 |
| Figure 12. Corrélation entre la présence de 5-hmC, de marques épigénétiques activatrices et de facteurs de transcription caractéristiques du développement érythroïde..... | 176 |
| Figure 13. Immunoprécipitation des protéines TET1, TET2 et IKAROS dans les cellules de la lignée murine MEL et des protéines TET1 et IKAROS dans les cellules de foies fœtaux..... | 180 |
| Figure 14. Expression des gènes <i>Hes1</i> , <i>Hey2</i> et <i>HeyL</i> dans les cellules érythroïdes de foies fœtaux murins Ik ^{WT} et Ik ^{NULL} | 182 |
| Figure 15. Enrichissement relatif du facteur IKAROS sur la région CpG des gènes <i>Hes1</i> , <i>Hey2</i> et <i>HeyL</i> dans les cellules érythroïdes de foies fœtaux Ik ^{WT} et Ik ^{NULL} | 183 |

Figure 16. Enrichissement relatif du facteur TET1 sur une région riche en CpG des gènes *Hes1*, *Hey2* et *HeyL* dans les cellules érythroïdes de foies fœtaux Ik^{WT} et Ik^{NULL}184

Figure 17. Enrichissement relatif de la marque hydroxyméthylcytosine (5-hmC) sur la région CpG des gènes *Hes1*, *Hey2* et *HeyL* dans les cellules érythroïdes de foies fœtaux Ik^{WT} et Ik^{NULL}185

Annexe I : Biological effect of IKAROS mutation and NOTCH activation.....xxvi

Annexe II. Implication du facteur IKAROS dans le recrutement du PRC2 et de son activité associée dans la lignée cellulaire humaine K562.....xxix

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|-------------------|--|
| 2-OG : | 2-Oxyglutarate |
| 5-caC : | 5-carboxylcytosine |
| 5-fC : | 5-formylcytosine |
| 5-mC : | 5-méthylcytosine |
| 5-hmC : | 5-hydroxyméthylcytosine |
| Ac : | Anticorps |
| ADN : | Acide désoxyribonucléique |
| ADNc : | Acide désoxyribonucléique complémentaire |
| ARN : | Acide ribonucléique |
| ARNase : | Ribonucléase |
| ARNm : | Acide ribonucléique messenger |
| ARNt : | Acide ribonucléique de transfert |
| BAF : | « Brg1/Brahma-Associated Factors » |
| BER: | « Base Excision Repair » |
| BET : | Bromure d'éthidium |
| BFU-E : | « Burst-Forming Unit-Erythroid » |
| CCPA : | Conseil Canadien de Protection des Animaux |
| CD : | Cluster de Différenciation |
| CDK : | « Cyclin Dependent Kinase » |
| CDKN1A : | « Cyclin Dependent Kinase inhibitor 1A » |
| C/EBP α : | « CCAAT-enhancer-binding protein alpha » |
| CFU-E: | « Colony-Forming Unit-Erythroid » |
| CH ₃ : | Groupe méthyle |

| | |
|-------------|--|
| CHD3/4 : | « Chromodomain-Helicase-DNA-binding protein $\frac{3}{4}$ » |
| ChIP : | Immunoprecipitation de la Chromatine |
| CPA : | Comité de Protection des Animaux |
| CpG : | di-nucléotides Cytosine-Guanine |
| Ct: | « Cycle threshold » |
| DDR: | « DNA Damage Response » |
| DLL1/DLL4 : | « Delta-Like 1/Delta-Like 4 » |
| DN: | Double Négatif |
| DNMT: | « DNA Methyltransferase » |
| dNTP : | Désoxyribonucléotide |
| DP : | Double Positif |
| DSIF : | « DRB Sensitivity-Inducible Factor » |
| E (ou e) : | jour embryonnaire (exemple : E14.5 (ou e14.5) pour 14.5 jours embryonnaires) |
| ECL : | « Enhanced Chemiluminescence » |
| EDTA : | Acide éthylènediaminetétraacétique |
| EGF : | « Epidermal Growth Factor » |
| EZH2: | « Enhancer of Zeste Homolog 2 » |
| FBS : | « Fetal Bovine Serum » |
| G1E-ER4: | « GATA-1 erythroid-estrogen receptor 4 » |
| GATA-1/2: | « GATA-binding factor-1/2 » |
| G-CSF: | « Granulocyte-Colony Stimulating Factor » |
| GFP: | « Green Fluorescent Protein » |
| Hb: | Hémoglobine |
| HDAC : | Histone Déacétylase |
| HES1: | « Hairy and Enhancer of Split homolog-1 » |

| | |
|---------------------|--|
| HEY2: | « Hairy and Enhancer of split related with YRPW motif-2 » |
| HEYL: | « Hairy and Enhancer of split related with YRPW motif-like » |
| hMeDIP: | Immunoprécipitation de l'ADN hydroxyméthylé |
| HMT: | Histone Méthyltransférase |
| HPRT: | Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransférase |
| HTZ: | Hétérozygote |
| IgG: | Immunoglobuline |
| Ik : | IKAROS |
| IL: | Interleukine |
| IMDM : | « Iscove's Modified Dulbecco's Medium » |
| IFN- γ : | Interféron-gamma |
| IP: | Immunoprécipitation |
| IR: | Irradiation |
| JAK: | Janus Kinase |
| KCL : | Chlorure de Potassium |
| KLF1: | « Kruppel-Like Factor 1 » |
| LiCL: | « Lithium Chloride » |
| LSD1 : | « Lysine-Specific histone Demethylase 1 » |
| MBD2/3 : | « Methyl-CpG Binding Domain protein 2/3 » |
| MeDIP: | Immunoprécipitation de l'ADN méthylé |
| MEL: | « Mouse Erythro-Leukemia » |
| MgCl ₂ : | Chlorure de Magnésium |
| MLL: | « Mixed-Lineage Leukemia » |
| MTA : | « Metastasis-Associated Protein » |
| NaAc: | Acétate de Sodium |

| | |
|------------------|---|
| NaCl: | Chlorure de Sodium |
| NELF: | « Negative Elongation Factor » |
| NF- κ B : | « Nuclear Factor-kappa B » |
| NICD: | « NOTCH Intracellular Domain » |
| NK: | « Natural Killer cell » |
| NRARP: | « NOTCH Regulated Ankyrin Repeat Protein » |
| NT: | Non-Traité |
| NuRD: | « Nucleosome Remodeling and Deacetylase complex » |
| ORF: | « Open Reading Frame » |
| PAF: | « Pol II Associated Factor 1 » |
| PBAF: | « Polybromo-associated BAF » |
| PBS: | « Phosphate Buffered Saline » |
| PCR: | « Polymerase Chain Reaction » |
| PHD: | « Plant Homeodomain » |
| PMSF: | « Phenylmethanesulfonyl fluoride » |
| Pol II: | ARN polymerase II |
| PP1/2A: | « Protein Phosphatase 1/2A » |
| PRC2: | « Polycomb Repressive Complex 2 » |
| PRDM16: | « PR/SET Domain 16 » |
| PTEF-b : | « Positive Transcription Elongation Factor-b » |
| PU.1: | « PU-box binding factor 1 » |
| PYR: | « Pyrimidin rich » |
| qPCR : | « quantitative Polymerase Chain Reaction » |
| QR: | Quantification Relative |
| qsp : | quantité suffisante pour |

| | |
|------------------|---|
| RBPJ- κ : | « Recombination signal sequence-Binding Protein J kappa » |
| rpm: | « rotation per minute » |
| RPMI: | « Roswell Park Memorial Institute medium » |
| RRHP : | « Reduced Representation 5-Hydroxymethylcytosine Profiling » |
| SCF : | « Stem Cell Factor » |
| SCR: | « Scramble » |
| SDS: | « Sodium Dodecyl Sulfate » |
| SDS-PAGE : | « Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis » |
| seq: | séquençage |
| shARN: | petit ARN en épingle à cheveux (« short hairpin » en anglais) |
| siARN: | petit ARN interférent |
| SWI-SNF: | « SWItch/Sucrose Non-Fermentable » |
| TAD: | « Transactivation Domain » |
| TAF: | « TBP-Associated Factor » |
| TBP : | « TATA-Binding Protein » |
| TBS : | « Tris Buffered Saline » |
| TBS-T : | « Tris Buffered Saline-Tween®20 » |
| TDG: | « Thymine DNA Glycosylase » |
| TE: | Tris-EDTA |
| TET: | « Ten-Eleven Translocation » |
| THP: | Tamm–Horsfall glycoprotéine |
| TNF- α : | « Tumor Necrosis Factor-alpha » |
| TP53: | « Transformation-Related Protein 53 » |
| TSS: | « Transcriptional Start Site » |
| TTS: | « Transcriptional Termination Site » |

UTR: « Untranslated Transcribed Region »

WB: « Western Blot »

WT: « Wild-Type »

ZNF: « Zinc Finger »

“

La valeur d'un homme tient dans sa capacité
à donner et non dans sa capacité à recevoir.

”

Albert Einstein

“

Quoi que tu rêves d'entreprendre, commence-le.

L'audace a du génie, du pouvoir, de la magie.

”

Goethe

PARTIE I : Introduction

1.1. L'hématopoïèse

Le développement du réseau des cellules hématopoïétiques est un processus hautement régulé dans lequel des cellules souches multipotentes se différencient, par l'intermédiaire de précurseurs, pour produire tous les types cellulaires du sang (1). Le développement des cellules hématopoïétiques prend place dans différents sites au cours du développement embryonnaire (2). Tout commence dans le sac vitellin à partir du 7ème (souris) ou 15ème (humain) jour embryonnaire dans lequel les hémangioblastes produisent des progéniteurs myélo-érythroïdes donnant lieu à des cellules érythroïdes nucléées et qui portent une globine embryonnaire : c'est le développement primitif. A partir de 11.5 jours (souris) ou de 8-10 semaines (humain), la production se déplace dans le foie lors du développement définitif. À ce stade, tous les types cellulaires sont produits et les cellules érythroïdes produites sont composées, en premier lieu, de chaînes de globine fœtale et, subséquemment, de chaînes de globine adulte. Après la naissance, la moelle osseuse devient le foyer principal de production des cellules hématopoïétiques et le restera durant toute la vie adulte chez l'humain et la souris (1-3) (Figure 1).

Dans les étapes précoces du développement hématopoïétique, les cellules souches hématopoïétiques situées dans la moelle osseuse s'engagent, par l'entremise de différents signaux discriminants, vers la production de progéniteurs multipotents à partir desquels sont produits les progéniteurs lymphoïdes communs ou les progéniteurs myéloïdes communs. Les progéniteurs lymphoïdes peuvent alors se différencier en cellules T, B ou NK tandis que les progéniteurs myéloïdes ont la capacité de se différencier en mégacaryocytes, érythrocytes (progéniteur intermédiaire érythro-mégacaryocytaire) mais aussi granulocytes et macrophages (progéniteur intermédiaire granulo-myéloïde) (4).

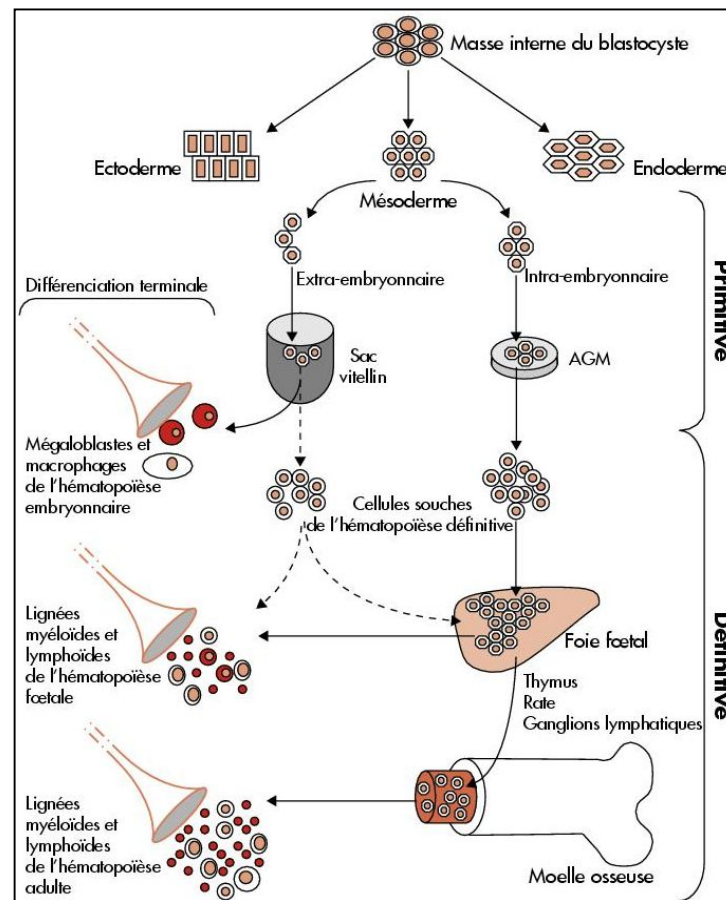


Figure 1. Sites de production des cellules hématopoïétiques.

(Adapté de la référence (5))

L'hématopoïèse embryonnaire (ou primitive) se déroule au cours des jours 7.5 à 10.5 chez la souris et des semaines de gestation 2 à 8 chez l'humain. Elle débute dans le sac vitellin et plus précisément à partir du mésoderme extra-embryonnaire. Parallèlement, la voie définitive commence à prendre place dans la région aorte-gonade-mésonephros (AGM) aux jours murins 9-11. Les progéniteurs du sac vitellin et de l'AGM transfèrent ensuite dans le foie dans lequel la voie définitive prend place dans un seul et même endroit. Après la naissance, la moelle osseuse devient la principale source de cellules du sang en plus du thymus, de la rate et des ganglions lymphatiques.

En réponse à des signaux précoces de différenciation, les cellules souches perdent graduellement leur capacité d'auto-renouvellement (4). Leur capacité de différenciation est caractérisée par l'altération de leur potentiel de différenciation dans de multiples lignages hématopoïétiques. L'induction d'un signal favorisant un lignage spécifique peut entraîner la perte de potentiel de la cellule souche/progénitrice à se différencier dans les autres lignages (1). Sans signal spécifique, les progéniteurs multipotents perdent en premier le potentiel érythro-mégacaryocytaire, devenant alors (i) des progéniteurs lymphoïdes communs ou (ii) plus globalement des progéniteurs multipotents lymphoïdes, capables alors de se différencier dans tous les autres types cellulaires (de progéniteurs granulo-myéloïde ou de progéniteurs lymphoïdes communs). Ces deux voies potentielles sont encore discutées et aucune des deux n'est à ce jour mis en avant (voir modèle classique et modèle révisé, Figure 2) (6).

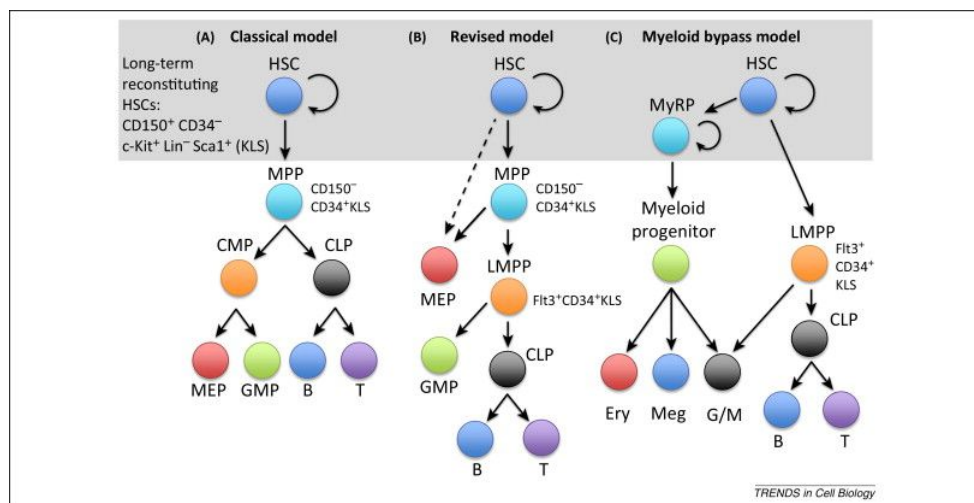


Figure 2. Différents modèles de différenciation des cellules hématopoïétiques.

(Adapté de la référence (6))

Les trois modèles proposent différentes alternatives possibles par lesquelles une cellule souche hématopoïétique peut se différencier. (A) Dans le modèle classique, les cellules souches hématopoïétiques

(« HSC » en anglais) donnent lieu exclusivement aux progéniteurs multipotents (« MPP » en anglais) qui produisent les progéniteurs myéloïdes communs (« CMP » en anglais) et les progéniteurs lymphoïdes communs (« CLP » en anglais). Par la suite, les progéniteurs myéloïdes communs produisent les progéniteurs érythro-mégacaryocytaires (« MEP » en anglais) et les progéniteurs granulo-myéloïdes (« GMP » en anglais), tandis que les lignages lymphoïdes B et T émanent du progéniteur lymphoïde commun. (B) Le modèle révisé présente une première alternative au modèle classique : les progéniteurs érythro-mégacaryocytaires pourraient directement provenir des cellules souches hématopoïétiques. Dans ce sens, les progéniteurs multipotents, toujours produits pas les cellules souches hématopoïétiques, donneraient lieu à des progéniteurs multipotents lymphoïdes (« LMPP » en anglais) qui à leur tour produiraient les progéniteurs granulo-myéloïdes et les progéniteurs lymphoïdes communs. (C) Le dernier modèle met à jour un progéniteur exclusivement myéloïde (« MyRP » en anglais) et qui a conservé la capacité d'auto-renouvellement comme les cellules souches hématopoïétiques desquelles il émane. Le progéniteur exclusivement myéloïde produit ensuite un progéniteur myéloïde (qui n'a plus la capacité de s'auto-renouveler) qui se différencie directement vers l'érythropoïèse, la mégacaryopoïèse ou la granulopoïèse. Dans ce modèle, les progéniteurs multipotents lymphoïdes proviennent alors directement des cellules souches hématopoïétiques et donnent les progéniteurs lymphoïdes communs qui se différencient dans le lignage B ou T.

De ce fait, des facteurs spécifiques à l'engagement vers un lignage particulier ont été déterminés et leur expression témoigne du stade/lignage dans lequel une cellule se situe.

Nous avons orienté l'étude vers le développement myéloïde et plus particulièrement érythro-mégacaryocytaire en raison de l'importance de l'érythropoïèse et des nombreuses maladies se rattachant à une mauvaise production ou fonctionnement de ces cellules (7-9). De plus, une grande variété de maladies existantes sont d'origine myéloïde (10, 11).

1.1.1. Le développement myélo-érythroïde

L'engagement myéloïde peut s'effectuer selon plusieurs voies différentes. En effet, bien que les progéniteurs érythro-mégacaryocytaires doivent provenir directement des progéniteurs

myéloïdes communs (ou des cellules souches hématopoïétiques) (12), les progéniteurs granulo-myéloïdes quant à eux peuvent émaner soit des progéniteurs myéloïdes communs, soit des progéniteurs multipotents lymphoïdes (cette dernière source représentant tout de même un plus faible pourcentage) (12).

Les progéniteurs granulo-myéloïdes peuvent produire les cellules macrophages, neutrophiles, éosinophiles, basophiles ou encore les monocytes alors que les progéniteurs érythro-mégacaryocytaires sont capables de produire les érythrocytes et mégacaryocytes. Le progéniteur myéloïde commun aura autant de possibilités de s'engager dans l'une ou l'autre des deux voies, dépendant alors de la signalisation en provenance de la niche du progéniteur (13).

1.1.1.1. Facteurs impliqués dans le développement érythro-mégacaryocytaire

L'engagement vers l'une ou l'autre de ces voies (érythro-mégacaryocytaire ou granulo-myéloïde) est caractérisé par un patron d'expression de facteurs de transcription et notamment par l'expression des facteurs GATA-1, GATA-2 et PU.1 (14-16). Le facteur GATA-1 est exprimé à de hauts niveaux dans le lignage érythro-mégacaryocytaire (17, 18) tandis que GATA-2 est un facteur exprimé dans les cellules progénitrices hématopoïétiques (19), les stades précoces du lignage érythro-mégacaryocytaire (20) mais aussi dans la voie granulo-myéloïde où il se trouve en co-expression spécifique avec la protéine C/EBP- α dans les éosinophiles (21) ou seul (sans C/EBP- α) dans les mastocytes (21, 22). Le facteur PU.1 quant à lui est requis pour le lignage lympho-myéloïde et réprimé seulement dans les progéniteurs érythro-mégacaryocytaires (21). La différenciation des cellules érythroïdes et mégacaryocytes est accompagnée par une augmentation de l'expression du facteur GATA-1 et une diminution

de GATA-2, PU.1 et KIT. GATA-1 éteint alors l'expression de *Gata2* et remplace celui-ci aux éléments de régulation des gènes *Kit*, *Sfpi1* et *Gata2*, permettant ainsi d'orienter la différenciation des progéniteurs immatures vers une différenciation érythro-mégacaryocytaire (23-25). Le facteur de transcription IKAROS accompagne GATA1 dans cette transition puisqu'il participe à son recrutement sur le promoteur du gène *Gata2* dans les cellules érythroïdes (26).

1.1.1.2. Biologie des cellules érythroïdes

Les cellules progénitrices en voie de devenir des érythrocytes parcourent différents stades de différenciation érythroïde : BFU-E (pour « burst-forming unit-erythroid » et qui prolifèrent lentement), CFU-E (pour « colony-forming unit-erythroid » et qui prolifèrent activement) avant d'arriver au stade d'érythroblastes (27). L'érythropoïétine, facteur de croissance, est un élément indispensable à leur survie à partir du stade CFU-E (27, 28). Les cellules subissent donc des changements concrets au cours des différents stades de différenciation et maturation, aboutissant en dernier lieu à l'énucléation des érythrocytes (Figure 3). Au stade adulte, deux à trois millions d'érythrocytes sont produits chaque seconde dans la moelle osseuse et libérés dans la circulation sanguine où ils y résident en moyenne cent vingt jours avant d'être éliminés par l'érythrophagocytose produite principalement par les macrophages au niveau de la rate, du foie et de la moelle osseuse (29).

Dans des conditions normales, ils représentent 40 % des cellules circulant dans le sang et sont caractérisés par leur production d'hémoglobine, capable de lier l'oxygène. L'hémoglobine adulte est composée de quatre métalloprotéines de globine (deux α -globines et deux β -globines) portant chacune un groupe non protéique Heme, responsable de la liaison des

ligands gazeux tels que l'oxygène, le dioxyde de carbone, le monoxyde de carbone et le monoxyde d'azote (30).

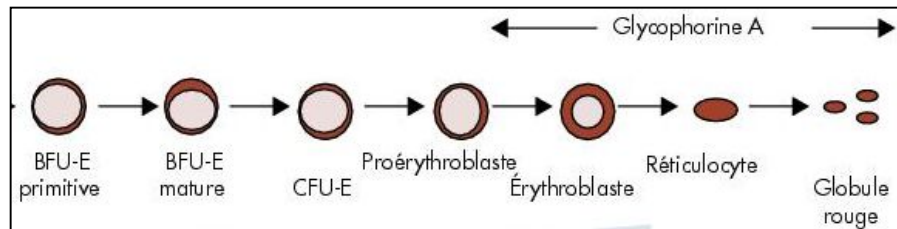


Figure 3. Développement des cellules érythroïdes

(Adapté de la référence (31))

Le modèle présenté ci-dessus est issu du groupe de Courtois et al (31) et présente le lignage érythroïde. Cependant, le développement érythroïde est initié, en amont, dès la cellule souche hématopoïétique qui mature en progéniteur commun érythro-myéloïde, puis en progéniteur érythro-mégacaryocytaire avant de poursuivre vers le lignage spécifique érythroïde présenté dans la figure. Une première étape d'expansion vers les BFU-E (pour « burst-forming unit-erythroid ») est alors enclenchée. L'expansion se poursuit par la prolifération active des CFU-E (pour « colony-forming unit-erythroid ») puis des érythroblastes au cours desquels la cellule mature. Les érythroblastes sont caractérisés par la détection de Glycophorine A, marqueur de différenciation érythroïde. Ils procèdent ensuite à l'arrêt de leur cycle cellulaire et on assiste à la polarisation de leur noyau, menant à l'énucléation et la maturation vers un érythrocyte (globule rouge) qui peut à ce stade circuler dans le sang.

L'expression de la globine est finement contrôlée au cours de l'érythropoïèse : par exemple, la région génomique du *locus* de la β -globine est composée d'une suite de gènes de globine qui adopteront une expression séquentielle au cours des stades de développement embryonnaire

(gène epsilon ou ϵ), fœtal (gènes gamma ou γ), pour finalement aboutir à l'expression de la forme adulte (gènes delta ou δ et beta ou β) (hématopoïèse définitive) (Figure 4) (32).

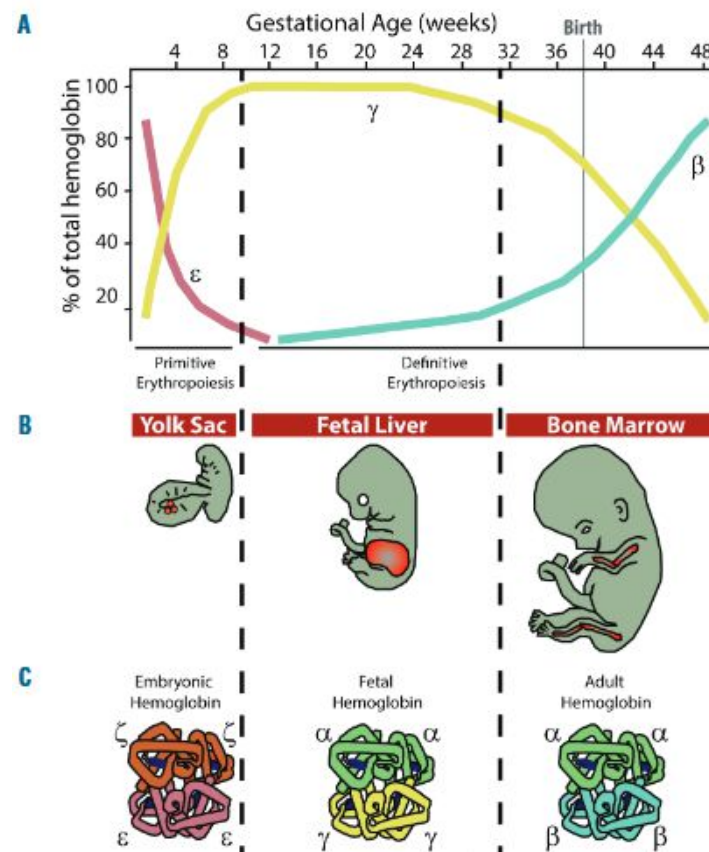


Figure 4. Production embryonnaire, fœtale et adulte de l'hémoglobine.

(Adapté de la référence (32))

A) Répartition de la production de globine du locus de la β -globine en fonction du stade embryonnaire (érythropoïèse primitive), fœtal ou adulte (érythropoïèse définitive) chez l'humain. B) Emplacement de la production d'hémoglobine (cellules érythroïdes) au cours du développement : sac vitellin au stade embryonnaire, foie au stade fœtal et moelle osseuse au stade adulte. C) Structure de l'hémoglobine au stade embryonnaire, fœtal et adulte (les chaînes du haut sont issues du locus de α -globine et les chaînes du bas sont issues du locus de β -globine).

Un défaut dans le développement des érythrocytes (prolifération, différenciation, apoptose) pourrait avoir de graves répercussions non seulement sur l'Homéostasie des érythrocytes, mais aussi sur la production de globine et donc sur le transport d'oxygène, pouvant amener au diagnostic d'anémie (9).

L'anémie peut se développer à la suite de différentes dysfonctions biologiques. Elle est détectée chez les patients dont le niveau d'hémoglobine fonctionnelle est relativement bas. Une carence nutritionnelle en fer en est majoritairement la cause, mais les sources génétiques et moléculaires se démarquent par leur abondance et leur gravité. On compte entre autres, les maladies inflammatoires chroniques, de même que les drépanocytoses et thalassémies comme déclencheurs importants de l'anémie (33-35).

Les maladies chroniques regroupent principalement les maladies infectieuses, auto-immunes, cancéreuses ou encore les maladies rénales (33). L'inflammation chronique qui en résulte est caractérisée par la production de diverses cytokines afin de recruter les cellules immunitaires adaptées au contexte. Le recrutement chronique du TNF- α (pour « Tumor Necrosis Factor- α »), de l'IFN- γ (pour « Interferon- γ ») et des interleukines IL-1 et IL-6 va altérer considérablement la production d'hémoglobine chez le patient. C'est notamment le métabolisme du fer qui est impacté ici. L'IL-6 et le IFN- γ vont ainsi priver les cellules érythroïdes de l'apport en fer en empêchant son transport et son absorption (36). Indépendamment du fer, l'IFN- γ et le TNF- α sont aussi capables d'inhiber directement le développement des précurseurs érythroïdes en entraînant leur apoptose (37, 38) alors que l'IL-6 agit plutôt en fin de maturation en diminuant de façon drastique la synthèse d'hémoglobine, par inhibition du gène *SLC4a1* (39). L'âge du malade est un déterminant dans le

développement de ce type d'anémie puisque tous ces effets se verront amplifiés chez les sujets plus âgés (40).

L'une des maladies héréditaires les plus communes dans le monde est caractérisée par la mutation ou la diminution d'expression de l'une des deux principales globines. Par exemple, la mutation de la chaîne adulte β peut rendre celle-ci peu ou non fonctionnelle et causer une anémie falciforme (drépanocytose) ou bien, elle peut créer un déséquilibre dans la production des chaînes de globine α et β , ce qui est à l'origine du développement de α -thalassémie (hémoglobine sans chaîne α ou taux faible) ou β -thalassémie (hémoglobine sans chaîne β ou taux faible) (34, 35, 41, 42).

On observe chez les patients atteints de α -thalassémie différents degrés de la maladie, dépendant du nombre de gènes de α -globine touchés par une délétion au niveau du *locus* de l' α -globine. Ce sont les patients portant une délétion sur au moins trois gènes sur quatre qui présenteront les symptômes les plus critiques. La maladie de HbH est caractérisée par la forte production d'une hémoglobine portant principalement quatre chaînes de β -globine et les sujets atteints présentent une anémie, une splénomégalie, mais aussi une surcharge ferrique augmentant avec l'âge (42). Une délétion présente sur les quatre gènes de globine- α est à l'origine du syndrome le plus sévère de α -thalassémie : l'Hydrops fœtal de Bart (41). Son diagnostic se fait intra-utérin et les sujets ont très peu de chances de survie à la naissance. L'oxygène ne peut se rendre aux tissus et le fœtus souffre d'hypoxie générale, mais aussi d'une anémie sévère, une insuffisance cardiaque et une splénomégalie importante (41, 42).

Contrairement aux α -thalassémies dont environ deux cents mutations (surtout de type délétion) différentes sur le *locus* de la α -globine peuvent en être l'origine, les β -thalassémies peuvent être causées par plus de quatre cents mutations différentes (notamment substitutions et insertions de nucléotide) sur le *locus* de la β -globine (selon <http://www.ithanet.eu/db/ithagenes>). Elle est détectée chez les sujets âgés d'au moins six mois post-partum (ayant complété leur changement de globine fœtale γ vers adulte β) et 1.5 % de la population mondiale en est porteur, allant de la forme asymptomatique à la forme la plus grave, appelée β -thalassémie majeure. On observe chez ces derniers une anémie sévère, une hépato-splénomégalie et une surcharge en fer causées par une érythropoïèse non fonctionnelle et délocalisée (43). L'augmentation du nombre d'érythroblastes dans la moelle osseuse entraîne une expansion anormale de celle-ci et une ostéoporose y est souvent associée (44). Des transfusions et des traitements proposant la prise de chélateurs ferriques permettent d'accroître l'espérance de vie des patients qui ne dépassent pas la vingtaine d'années de vie sans traitement adapté. Depuis quelques années, de nouvelles molécules aux effets prometteurs sont testés en essai clinique pour améliorer la qualité de l'érythropoïèse chez les patients thalassémiques. Celles-ci ciblent l'activation au stade adulte de gènes de globine fœtale dont les globine- γ (45) et/ou la différenciation/maturation des cellules érythroïdes: une molécule permettant de piéger le ligand d'activine et des inhibiteurs de la voie JAK-2 (46-49).

La drépanocytose (ou anémie falciforme) représente la maladie héréditaire la plus commune chez l'humain et se caractérise par la production et circulation d'une hémoglobine S (appelée Hb S) dans le sang. Le degré de la maladie dépend du génotype du malade dont les symptômes critiques se déclarent chez les sujets homozygotes pour Hb S ou bien hétérozygotes pour Hb S

et porteurs d'une mutation invalidant la β -globine sur l'autre allèle (β -thalassémie) (34). La production d'une telle hémoglobine est due à une mutation ponctuelle située sur le gène de la β -globine et qui entraîne un changement dans la séquence d'acides aminés de la protéine codée (acide glutamique remplacé par la valine) (34).

La Hb S produite va se polymériser pour former des fibres/cristaux, conférant au globule rouge une certaine rigidité, responsable de la forme faucille caractéristique de la maladie (50, 51). Le patient vivra toute sa vie avec des épisodes de crise (polymérisation de la Hb S), entrecoupés d'épisodes moins sévères (dépolymérisation de Hb S). Les fonctions normales de l'érythrocyte anucléé circulant sont totalement altérées par la polymérisation qui entraîne alors : (i) un stress oxydatif cellulaire (52, 53), (ii) une capacité amoindrie à capter l'oxygène (54), (iii) la libération de cytokines inflammatoires (55, 56), (iv) une obstruction des petits vaisseaux sanguins due à l'adhérence amplifiée avec les cellules endothéliales (57, 58) ou les neutrophiles (55), (v) des dommages endothéliaux (59, 60) et (vi) leur phagocytose précoce durant les épisodes de vaso-obstruction (61, 62). Des traitements encourageants, dont la molécule GBT440 qui est en cours de phase III d'essai clinique (Numéro NCT de l'essai clinique : NCT03036813), ciblent directement les épisodes de polymérisation en condition d'hypoxie (63).

L'ensemble de ces maladies décrites ci-haut représente seulement un échantillon des causes pouvant amener au diagnostic d'anémie due au dérèglement dans la production de l'hémoglobine. Les causes génétiques peuvent être nombreuses et se produire à tous les stades de développement érythroïde.

De façon évidente, amener une cellule progénitrice à se différencier dans une voie particulière sous-entend la participation active d'un réseau de facteurs (de transcription et de croissance) et de voies de signalisation. Outre les facteurs GATA-1, GATA-2 et PU.1 figurent aussi d'autres éléments indispensables pour contrôler adéquatement les étapes d'engagement de lignage, de prolifération et de différenciation des cellules érythro-mégacaryocytaires, tels que la voie de signalisation NOTCH et le facteur de transcription IKAROS.

1.2. Revue de littérature : “IKAROS: From chromatin organization to transcriptional elongation control”

**IKAROS: From chromatin organization to transcriptional
elongation control**

Maud Lemarié^{1,2} and Eric Milot^{1,2#}

¹Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center; and ²Faculty of Medicine, University of Montreal, 5415 boulevard de l'Assomption, Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4

[#]To whom correspondence should be addressed. email: e.milot.1@umontreal.ca

ABSTRACT

The transcription factor IKAROS (IKZF1) was first described as an important regulator of the lymphoid specific genes *Cd3δ* and *Dnmt* [1-3]. Subsequent investigations led to the identification of numerous genes regulated by IKAROS, and demonstrated the importance of this transcription factor in lymphoid as well as in other hematopoietic cells [4-9]. Characterization made in mouse models indicated that it is required for differentiation of multipotent hematopoietic progenitors to common lymphoid progenitors [9-11], and that the absence of IKAROS results in the lack of B cells, NK cells, and peripheral lymph node as well as fetal T cells [9, 12-15]. IKAROS importance is not limited to lymphopoiesis since it also influences homeostasis and/or functions of myeloid and erythroid cells [7, 14, 16-21]. This transcription factor is frequently associated to gene repression [22, 23], but can also be required for the transcriptional activation of specific genes [24-27]. IKAROS capacity to either promote gene repression or activation remains poorly understood but could stem in its ability to interact with different proteins and complexes affecting chromatin organization and Pol II pausing to specific genes. In here, we will review the biology and mechanisms used by IKAROS to regulate gene expression in hematopoietic cells.

IKAROS family of factors and isoforms

IKAROS is a Krüppel-like zinc finger protein and it is the founding member of a family of transcription factors, which also includes HELIOS (IKZF2), AIOLOS (IKZF3), EOS (IKZF4) and PEGASUS (IKZF5) [1, 28-32]. These factors have different patterns of expression during hematopoiesis but can co-express in specific cells (*e.g.*, IKAROS, AIOLOS and HELIOS in B and T cells). Structurally, proteins of this family are characterized by two sets of highly conserved C2H2 zinc-fingers [26, 27]. Two of these zinc-fingers are included in the C-terminal part of the protein and are required for dimerization [13]. The other C2H2 zinc-fingers are in N-terminal and are composed of 3 (PEGASUS) or 4 (other members of the family) fingers [13, 26, 28, 30-32]. The N-terminal zinc-fingers are required for DNA sequence recognition and binding [26]. But for PEGASUS, which recognizes the DNA sequence 'GNNNGNNG', the core DNA sequence 'GGGAA' is recognized and bound by the other members of the family [26, 32]. Gene specific and genome wide analyses indicated that factors of this family primarily bind promoter regions and are implicated in regulation of multiple genes [4, 33-35].

The expression and functionality of these factors are affected by alternative splicing, which promote the formation of different isoforms (rev in [36]). Importantly, certain isoforms have a dominant negative effect and perturb gene regulation [13, 37]. Dominant negative (DN) isoforms do not have the capacity to bind DNA efficiently, but maintain the ability to dimerize with self or other proteins of the family [2, 13, 26, 30, 31]. Thus, this family of factors can produce a large collection of hetero- and homodimers to influence gene regulation in

hematopoietic cells [27, 30, 31]. Whether each isoform affects gene regulation differently and can modify hematopoietic cell transcriptome, is however, not known.

Some isoforms can be expressed at high levels in specific population(s) of hematopoietic cells. For instance, IK-1 is the predominant isoform of IKAROS in lymphoid cells and the IK-X isoform (IK-3a; Figure 1) is reported to be the most abundant isoform in myeloid cells [38]. The small isoforms of these factors are expressed at low levels in non-malignant hematopoietic cells. However, allelic deletion and/or overproduction of some of these small isoforms has been linked to hematological malignancies. For instance, deletion of HELIOS (*IKZF2*^{-/-}) in mice results in depletion of regulatory T cells (T_{regs}) and defective regulatory activity as well as autoimmunity [34]. Furthermore, short isoforms of HELIOS are overproduced in T-ALL and could favor leukemia by the disruption of HELIOS activity [36, 39-41]. IKAROS deletion or overproduction of short isoforms also affects hematopoiesis and frequently characterizes specific forms of leukemia (see following section and reviewed in [36]).

IKAROS biology and malignancies

The IKAROS gene, *IKZF1*, includes 8 exons and the full-length protein (IK-1 isoform) is composed of 519 amino acids in human and 517 amino acids in mice. Due to alternative splicing some or all of the N-terminal zinc-fingers (F1 to F4) can be absent from specific IKAROS isoforms (Figure 1). The investigation of IKAROS integrity in patient ALL cells indicated that in addition to alternative splicing, mutation of *IKZF1* gene frequently leads to formation of IKAROS ‘variants’, which are similar to certain isoforms presented in Figure 1. These IKAROS variants results from somatic and germline mutations [42, 43]. Furthermore,

the characterization of ALL samples demonstrated that *IKZF1* heterozygote or homozygote deletion is also common to this malignancy. The best-defined isoforms/variants (hereafter commonly referred to as isoforms) of IKAROS are IK-1 to IK-8 (Figure 1). IK-1, IK-2 and IK-3/IK-3a can bind double strand DNA (dsDNA) and IK-4/IK-4a are capable to bind hairpin DNA formation [26]. IKAROS isoforms missing two or more of the N-terminal zinc-fingers, no longer bind dsDNA but maintain the ability to form homo- and heterodimers [26, 27, 44]. These isoforms can therefore interact and displace functional IKAROS isoforms (long isoforms capable to bind dsDNA) and potentially, other interacting factors. Hence, when overexpressed, these isoforms have a dominant negative (DN) effect since they can favor disruption of gene regulation imposed by IKAROS. High-level expression of IKAROS DN isoforms is frequent in child acute lymphoblastic leukemia (ALL), and is associated with poor prognosis [36, 39, 40, 42, 43, 45, 46].

The IKAROS DN isoforms IK-6 has been particularly studied and is the best described DN isoform. IK-6 is frequently overexpressed in ALL and it is also detected at high frequency in the accelerated and blast crisis phase of chronic myeloid leukemia (CML) [36, 47, 48]. The functional importance of IK-6 expression during hematopoiesis and development of leukemia characterized by the BCR-ABL1 translocation was demonstrated in mouse and human hematopoietic cells [47, 49]. This isoform is characterized by the deletion of exons 4, 5, 6 and 7, and hence, lacks all N-terminal zinc-fingers (F1 to F4, required for DNA binding) as well as the protein nuclear localization signal. Consequently, IK-6 isoform accumulates in the cytoplasm of hematopoietic cells and imposes the nuclear depletion of IKAROS since it maintains the ability to form homodimers, with other isoforms [45, 50].

The effect of the overproduction of other IKAROS DN isoforms common in ALL [36, 40, 43, 45, 46] [42], has been poorly investigated. Whether, like IK-6, they can favor development of leukemia by displacement of IKAROS or are ‘by-products’ of deregulated process(es) in leukemic cells, is not known. Nonetheless, since 2 to 4 of their N-terminal zinc fingers (F1-F4) are missing but they maintain the integrity the C-terminal zinc-fingers F5 and F6, they are all considered as DN isoforms.

IKAROS interacting partners and transcriptional repression

The combined activity of transcription factors and specific cofactors recruited to gene regulatory regions is critical to define gene regulation and the transcription program of cells. Thereby, they define the identity of individual cells. DNA sequences at gene regulatory regions and protein-protein interactions are therefore required to promote the activation or repression of specific genes.

In addition to the transcription factors of the IKAROS family, the transcription factors and master regulators RUNX1, TAL1, PU.1 and GATA-1, -2 and -3, are among the hematopoietic transcription factors reported to function and/or physically interact (direct or indirect interaction) with IKAROS in order to regulate gene expression and define the transcription program of specific hematopoietic cells [51, 52]. Together with IKAROS, they can promote recruitment of cofactors with complementary activities and thereby, control gene transcription by acting on chromatin structure and organization of gene regulatory regions. Among cofactors required for the IKAROS influence over transcriptional regulation are those included in the nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complex [53-55]. The chromatin recruitment of IKAROS with subunit(s) of NuRD has been demonstrated at multiple IKAROS

target genes [35]. The prevalent interaction between IKAROS and subunits of this complex was first found in a yeast two-hybrid screen that demonstrated the interaction of IKAROS and AIOLOS with the chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3 (CHD3; Mi2 α) and CHD4 (Mi2 β) [53]. CHD3 and CHD4 are mutually exclusive and are providing nucleosome remodeling activity to the NuRD complex [56]. In addition to CHD3 and CHD4, other subunits of the NuRD can be exchanged and could influence NuRD interaction/activity [56]. For instance, the NuRD subunit MBD2 can be replaced by MBD3. MBD2 preferentially binds methylated CpGs while MBD3 interacts with hydroxyl- and formyl-methylated CpGs [57, 58]. Mutations in the potential methyl-binding domain of MBD3 prevents the binding of this protein to methylated CpG [59, 60]. Furthermore, in recent years, different groups questioned the integrity of the NuRD complex and demonstrated that it is composed of two sub-modules that are catalytically active together or separately [61]. CHD4 (or CHD3) is now considered as a peripheral subunit included in a sub-module with GATAD2A or GATAD2B and CDK2ap1. For NuRD formation, the CHD4 sub-module needs MBD3 or MBD2 to interact with the nucleosome deacetylase sub-module ‘NuDe’, which includes HDAC1 and 2, the RBBP4 and RBBP7 and two MTA factors (MTA1, 2 and/or 3) [61-63]. Thereby, the deacetylase and nucleosome remodeling activities can be united in the same chromatin complex (NuRD). Thus, IKAROS might interact with CHD3 and CHD4 outside of the NuRD complex.

In erythroid cells, IKAROS was found to also interact with the PYR complex [64], which is composed of subunits of the chromatin remodeling complex SWI/SNF (BAF) and subunits of the NuRD complex, including CHD4 [65]. This complex can favor the transcriptional switch from γ - to β -globin genes during development [16]. The importance of IKAROS in γ -globin

gene repression and recruitment of CHD3/4 as well as HDAC1 was subsequently demonstrated [17, 66]. Thus, IKAROS might indeed interact with CHD3, CHD4 and other subunits of the NuRD in other context or complexes.

In addition to IKAROS interaction with the NuRD and the PYR complex [16, 55], its interactions with Sin3A, Sin3B, Sin3BSF, CtIP, Rb and EZH2 [8, 22, 53, 55, 67], are also likely to favor the transcriptional repression of IKAROS target genes by the control of chromatin and promoter organizations [8, 13, 17, 24, 53, 66]. Among these factors, the functional association between IKAROS and the histone H3 methyltransferase EZH2 (catalytic subunit of the Polycomb Repressive Complex 2; PRC2 [68]) has been studied extensively, especially for the implication of IKAROS in regulation of NOTCH target genes in lymphoid as well as in myeloid and erythroid cells [4, 8, 20, 69-71]. A genome wide analysis revealed that a large number of NOTCH target genes are transcriptionally repressed by IKAROS in T cells [8]. These repressed genes are characterized by the enrichment of the histone post-translational modification H3K27me₃, which is produced by EZH2/PRC2 [68]. To produce a comparative analysis of the effect of IKAROS on regulation of NOTCH target genes in presence or absence of signaling, mouse fetal liver erythroid cells were used since they are not substantially modified by NOTCH signaling [72, 73]. This comparative analysis demonstrated that, such as in lymphoid cells, IKAROS is implicated in the repression of many NOTCH target genes in erythroid cells (Lemarié et al. in preparation). In addition, this study indicated that IKAROS is not always involved in repression of NOTCH target genes since it is required for the activation of a sub-group of these genes. Such as for NOTCH target genes repressed by IKAROS [4], those requiring IKAROS for their activation upon signaling can be directly targeted by this transcription factor. The results of characterization made suggest that

IKAROS (i) favors the organization of a bivalent chromatin characterized by the simultaneous detection of H3K4me3 and H3K27me3 to these genes [74, 75]; and (ii) influences transcriptional elongation. Thus, IKAROS might be required to organize the chromatin and promoters of specific genes to favor their rapid activation/overexpression upon NOTCH signaling.

IKAROS interacting partners and transcriptional activation

In addition to control chromatin and promoter organizations, IKAROS can also participate to the regulation of proficient transcriptional elongation [76]. IKAROS can indeed interact with the CDK9 and CYCT1 subunits of the Positive Transcription Elongation Factor b (P-TEFb) [24, 77] and promotes the recruitment of this elongation complex to transcription start site (TSS) of target genes [77]. In mammalian cells, P-TEFb is the best-known activity capable to reactivate the promoter-proximal paused RNA Pol II [78-80], thereby promoting productive transcription elongation. P-TEFb phosphorylates the C-terminal domain (CTD) of the large subunit of Pol II on Ser2 [78-80] as well as the negative elongation factors DSIF and NELF [80]. In the nucleus, most of P-TEFb is inactive and sequestered in the 7SK snRNP repressive complex, which includes the 7SK RNA, HEXIM1, the La-related LARP7 protein, and the methyl phosphatase capping enzyme MePCE [81-84]. The CDK9/P-TEFb is then inactive and CDK9 function is contingent on its phosphorylation status [85, 86]. The phosphatases PP1 and PP2B dephosphorylate CDK9 and thereby, favor P-TEFb dissociation from the inactive complex 7SK snRNP [85]. Interestingly, IKAROS can interact with PP1 [87], and this interaction promotes the productive transcriptional elongation of the IKAROS target genes *KIT* and *FLT3* in hematopoietic progenitor cells [77]. IKAROS then participates to the

recruitment of P-TEFb to these genes, the control of the promoter-proximal paused Pol II release and subsequently, the productive transcriptional elongation.

Importantly, the NuRD complex accompanies IKAROS when it interacts with P-TEFb and influences transcriptional elongation. Then, IKAROS, P-TEFb and NuRD are included in a 2MDa complex [76, 77]. Such as the chromatin remodeling complex FACT, which is reported to progress along with the transcriptional elongation complex [88], the remodeling activity of NuRD could favor Pol II progression by remodeling nucleosomes in the transcribed region of specific genes. Additionally, the association of histone deacetylases like the HDAC1/2 of the NuRD is not incompatible with transcriptional elongation. Indeed, in yeast the histone deacetylase Rpd3S can be associated to transcriptional elongation and prevents spurious transcription initiation within the open reading frame of genes by the removal of histone acetyl-groups [89-91]. Thus, although the NuRD complex is well-known for its repressive function, both enzymatic activities of the NuRD could be required to regulate the expression levels of specific genes by favoring elongation and preventing the formation of abnormal transcripts.

Interestingly, the IKAROS interaction with P-TEFb can be influenced by isoforms expression. Indeed, the IKAROS isoform IK-Δ (Figure 1), which uniquely misses exon 7 (previously, referred as the exon 6), cannot co-immunoprecipitate with the CDK9/P-TEFb [51]. The end of exon 7 overlaps with a portion of the IKAROS bipartite activation domain (Figure 1). Hence, this region of IKAROS could actually be required for IKAROS co-immunoprecipitation with CDK9/P-TEFb and for transcriptional elongation control. Other IKAROS isoforms are also characterized by the absence of exon 7 (Figure 1). Their overexpression is likely to affect

IKAROS capacity to interact with P-TEFb and influence the release of promoter-proximal paused Pol II.

CONCLUSION

Precise regulation of the tumor suppressor IKAROS is required to define the transcriptome of many hematopoietic cells. In addition to regulate expression of various lineage specific genes, IKAROS also influences genes required in cell cycle control, signaling and metabolism (reviewed in[40]). Among these, the effect of IKAROS on NOTCH target genes has been particularly investigated and IKAROS is described as a repressor of multiple NOTCH target genes in different hematopoietic cells. We recently demonstrated that IKAROS can exert the opposite effect on a group of NOTCH target genes and be required for their activation upon signaling (Lemarié et al., in preparation). Indeed, in erythroid cells, we found that IKAROS is mandatory for the activation of different genes upon NOTCH signaling. The analysis of chromatin and gene regulation suggests that IKAROS then favors the organization of a transcriptional paused structure characterized by bivalent chromatin organization of promoters with the characteristic enrichment of H3K4me3 and H3K27me3. The association of IKAROS to bivalent chromatin organization was previously reported in T cells [25] and hence, is not particular to IKAROS function and/or isoforms in erythroid lineage cells. The relation between chromatin bivalence and transcription pausing has been detected to multiple genes in neuronal progenitor cells and in differentiated neurons [92]. However, it remains to define how chromatin bivalence and Pol II pausing could be controlled and coordinated to specific genes. Intriguingly, like P-TEFb [85], activity of the H3K27me3 methyl-transferase EZH2 (PRC2) is reported to be influenced by the phosphatase PP1 [93], which is an interacting

partner of IKAROS [87]. Further investigation will be required to determine the precise role of IKAROS in the regulation of bivalent chromatin organization associated to paused Pol II, and to identify other factors potentially involved. Nonetheless, we propose that primarily, IKAROS participates to the organization of a poised state for gene expression while promoting bivalent chromatin structure and paused Pol II. Thereby, IKAROS permits subsequent rapid activation or repression of these genes according to differentiation, signaling and/or stress.

Finally, specific isoforms of IKAROS are likely to ‘lack’ certain interactions/abilities and affect specific aspect(s) of gene regulation but not others. Indeed, the precise effect of DN isoforms like IK-6 has been well characterized, but the effect of other DN or long isoforms has not been fully clarified. Interestingly, the long IKAROS isoform IK-Δ was found to interact with NuRD but not with CDK9/P-TEFb [51]. Long isoforms missing exon 7 (like IK-Δ) could influence the chromatin organization of target genes but are not likely to control Pol II pausing. Further, investigations of IKAROS isoforms are needed to fully understand their effect on gene regulation, hematopoiesis and leukemia development.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the laboratory members useful discussions. The author’s work is supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (CIHR MOP133420) held by E.M.

REFERENCES

1. Georgopoulos, K., D.D. Moore, and B. Derfler, *Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment*. Science, 1992. **258**(5083): p. 808-12.
2. Hahm, K., et al., *The lymphoid transcription factor LyF-1 is encoded by specific, alternatively spliced mRNAs derived from the Ikaros gene*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(11): p. 7111-23.
3. Lo, K., N.R. Landau, and S.T. Smale, *LyF-1, a transcriptional regulator that interacts with a novel class of promoters for lymphocyte-specific genes*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(10): p. 5229-43.
4. Geimer Le Lay, A.S., et al., *The tumor suppressor Ikaros shapes the repertoire of notch target genes in T cells*. Sci Signal, 2014. **7**(317): p. ra28.
5. Gomez-del Arco, P., et al., *Alternative promoter usage at the Notch1 locus supports ligand-independent signaling in T cell development and leukemogenesis*. Immunity, 2010. **33**(5): p. 685-98.
6. Ng, S.Y., et al., *Genome-wide lineage-specific transcriptional networks underscore Ikaros-dependent lymphoid priming in hematopoietic stem cells*. Immunity, 2009. **30**(4): p. 493-507.
7. Oh, K.S., et al., *Dual Roles for Ikaros in Regulation of Macrophage Chromatin State and Inflammatory Gene Expression*. J Immunol, 2018. **201**(2): p. 757-771.
8. Oravec, A., et al., *Ikaros mediates gene silencing in T cells through Polycomb repressive complex 2*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8823.

9. Schwickert, T.A., et al., *Stage-specific control of early B cell development by the transcription factor Ikaros*. Nat Immunol, 2014. **15**(3): p. 283-93.
10. Allman, D., et al., *Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors*. Nat Immunol, 2003. **4**(2): p. 168-74.
11. Yoshida, T., et al., *Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros*. Nat Immunol, 2006. **7**(4): p. 382-91.
12. Avitahl, N., et al., *Ikaros sets thresholds for T cell activation and regulates chromosome propagation*. Immunity, 1999. **10**(3): p. 333-43.
13. Georgopoulos, K., *Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(3): p. 162-74.
14. Wang, J.H., et al., *Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation*. Immunity, 1996. **5**(6): p. 537-49.
15. Winandy, S., et al., *Pre-T cell receptor (TCR) and TCR-controlled checkpoints in T cell differentiation are set by Ikaros*. J Exp Med, 1999. **190**(8): p. 1039-48.
16. Bank, A., *Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities*. Blood, 2006. **107**(2): p. 435-43.
17. Bottardi, S., et al., *Ikaros and GATA-1 combinatorial effect is required for silencing of human gamma-globin genes*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(6): p. 1526-37.
18. Cytlak, U., et al., *Ikaros family zinc finger 1 regulates dendritic cell development and function in humans*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1239.
19. Dumortier, A., et al., *Ikaros regulates neutrophil differentiation*. Blood, 2003. **101**(6): p. 2219-26.

20. Malinge, S., et al., *Ikaros inhibits megakaryopoiesis through functional interaction with GATA-1 and NOTCH signaling*. Blood, 2013.
21. Toubai, T., et al., *Ikaros-Notch axis in host hematopoietic cells regulates experimental graft-versus-host disease*. Blood, 2011. **118**(1): p. 192-204.
22. Koipally, J., et al., *Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes*. Embo J, 1999. **18**(11): p. 3090-100.
23. Sabbattini, P., et al., *Binding of Ikaros to the lambda5 promoter silences transcription through a mechanism that does not require heterochromatin formation*. Embo J, 2001. **20**(11): p. 2812-22.
24. Bottardi, S., et al., *Ikaros interacts with P-TEFb and cooperates with GATA-1 to enhance transcription elongation*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(9): p. 3505-19.
25. Harker, N., et al., *The CD8alpha gene locus is regulated by the Ikaros family of proteins*. Mol Cell, 2002. **10**(6): p. 1403-15.
26. Molnar, A. and K. Georgopoulos, *The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(12): p. 8292-303.
27. Sun, L., A. Liu, and K. Georgopoulos, *Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development*. Embo J, 1996. **15**(19): p. 5358-69.
28. Hahm, K., et al., *Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin*. Genes Dev, 1998. **12**(6): p. 782-96.
29. John, L.B. and A.C. Ward, *The Ikaros gene family: transcriptional regulators of hematopoiesis and immunity*. Mol Immunol, 2011. **48**(9-10): p. 1272-8.

30. Kelley, C.M., et al., *Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors*. Curr Biol, 1998. **8**(9): p. 508-15.
31. Morgan, B., et al., *Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation*. Embo J, 1997. **16**(8): p. 2004-13.
32. Perdomo, J., et al., *Eos and pegasus, two members of the Ikaros family of proteins with distinct DNA binding activities*. J Biol Chem, 2000. **275**(49): p. 38347-54.
33. Ferreiros-Vidal, I., et al., *Genome-wide identification of Ikaros targets elucidates its contribution to mouse B-cell lineage specification and pre-B-cell differentiation*. Blood, 2013. **121**(10): p. 1769-82.
34. Kim, H.J., et al., *Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios*. Science, 2015. **350**(6258): p. 334-9.
35. Zhang, J., et al., *Harnessing of the nucleosome-remodeling-deacetylase complex controls lymphocyte development and prevents leukemogenesis*. Nat Immunol, 2011. **13**(1): p. 86-94.
36. Rebollo, A. and C. Schmitt, *Ikaros, Aiolos and Helios: transcription regulators and lymphoid malignancies*. Immunol Cell Biol, 2003. **81**(3): p. 171-5.
37. Winandy, S., P. Wu, and K. Georgopoulos, *A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma*. Cell, 1995. **83**(2): p. 289-99.
38. Payne, K.J., et al., *Ikaros isoform x is selectively expressed in myeloid differentiation*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3091-8.
39. Heizmann, B., P. Kastner, and S. Chan, *The Ikaros family in lymphocyte development*. Curr Opin Immunol, 2018. **51**: p. 14-23.

40. Marke, R., F.N. van Leeuwen, and B. Scheijen, *The many faces of IKZF1 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia*. Haematologica, 2018. **103**(4): p. 565-574.
41. Nakase, K., et al., *Overexpression of novel short isoforms of Helios in a patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia*. Exp Hematol, 2002. **30**(4): p. 313-7.
42. Churchman, M.L., et al., *Germline Genetic IKZF1 Variation and Predisposition to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*. Cancer Cell, 2018. **33**(5): p. 937-948 e8.
43. Mullighan, C. and J. Downing, *Ikaros and acute leukemia*. Leuk Lymphoma, 2008. **49**(5): p. 847-9.
44. McCarty, A.S., et al., *Selective dimerization of a C2H2 zinc finger subfamily*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 459-70.
45. Sun, L., et al., *Expression of aberrantly spliced oncogenic ikaros isoforms in childhood acute lymphoblastic leukemia*. J Clin Oncol, 1999. **17**(12): p. 3753-66.
46. Sun, L., et al., *Expression of dominant-negative and mutant isoforms of the antileukemic transcription factor Ikaros in infant acute lymphoblastic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(2): p. 680-5.
47. Beer, P.A., et al., *A dominant-negative isoform of IKAROS expands primitive normal human hematopoietic cells*. Stem Cell Reports, 2014. **3**(5): p. 841-57.
48. Mullighan, C.G., et al., *BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 110-4.
49. Beer, P.A., et al., *Disruption of IKAROS activity in primitive chronic-phase CML cells mimics myeloid disease progression*. Blood, 2015. **125**(3): p. 504-15.
50. Iacobucci, I., et al., *Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the IKZF1 gene in a large cohort of BCR-ABL1-positive acute*

- lymphoblastic leukemia patients: on behalf of Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Acute Leukemia Working Party (GIMEMA AL WP). Blood, 2009. 114(10): p. 2159-67.*
51. Bottardi, S., et al., *Direct Protein Interactions Are Responsible for Ikaros-GATA and Ikaros-Cdk9 Cooperativeness in Hematopoietic Cells.* Mol Cell Biol, 2013. **33**(16): p. 3064-76.
 52. Novershtern, N., et al., *Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis.* Cell, 2011. **144**(2): p. 296-309.
 53. Kim, J., et al., *Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes.* Immunity, 1999. **10**(3): p. 345-55.
 54. Koipally, J., et al., *Ikaros chromatin remodeling complexes in the control of differentiation of the hemo-lymphoid system.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1999. **64**: p. 79-86.
 55. Sridharan, R. and S.T. Smale, *Predominant interaction of both Ikaros and Helios with the NuRD complex in immature thymocytes.* J Biol Chem, 2007. **282**(41): p. 30227-38.
 56. Lai, A.Y. and P.A. Wade, *Cancer biology and NuRD: a multifaceted chromatin remodelling complex.* Nat Rev Cancer, 2011. **11**(8): p. 588-96.
 57. Iurlaro, M., et al., *A screen for hydroxymethylcytosine and formylcytosine binding proteins suggests functions in transcription and chromatin regulation.* Genome Biol, 2013. **14**(10): p. R119.
 58. Yildirim, O., et al., *Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells.* Cell, 2011. **147**(7): p. 1498-510.

59. Hendrich, B. and A. Bird, *Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(11): p. 6538-47.
60. Saito, M. and F. Ishikawa, *The mCpG-binding domain of human MBD3 does not bind to mCpG but interacts with NuRD/Mi2 components HDAC1 and MTA2*. J Biol Chem, 2002. **277**(38): p. 35434-9.
61. Zhang, W., et al., *The Nucleosome Remodeling and Deacetylase Complex NuRD Is Built from Preformed Catalytically Active Sub-modules*. J Mol Biol, 2016. **428**(14): p. 2931-42.
62. Low, J.K., et al., *CHD4 Is a Peripheral Component of the Nucleosome Remodeling and Deacetylase Complex*. J Biol Chem, 2016. **291**(30): p. 15853-66.
63. Zhang, T., et al., *A variant NuRD complex containing PWWP2A/B excludes MBD2/3 to regulate transcription at active genes*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 3798.
64. O'Neill, D., et al., *Tissue-specific and developmental stage-specific DNA binding by a mammalian SWI/SNF complex associated with human fetal-to-adult globin gene switching*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(2): p. 349-54.
65. O'Neill, D.W., et al., *An ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(20): p. 7572-82.
66. Keys, J.R., et al., *A mechanism for Ikaros regulation of human globin gene switching*. Br J Haematol, 2008. **141**(3): p. 398-406.
67. Koipally, J. and K. Georgopoulos, *Ikaros-CtIP interactions do not require C-terminal binding protein and participate in a deacetylase-independent mode of repression*. J Biol Chem, 2002. **277**(26): p. 23143-9.

68. van Lohuizen, M., *The trithorax-group and polycomb-group chromatin modifiers: implications for disease*. Curr Opin Genet Dev, 1999. **9**(3): p. 355-61.
69. Chari, S., S.E. Umetsu, and S. Winandy, *Notch target gene deregulation and maintenance of the leukemogenic phenotype do not require RBP-J kappa in Ikaros null mice*. J Immunol. **185**(1): p. 410-7.
70. Dumortier, A., et al., *Notch activation is an early and critical event during T-Cell leukemogenesis in Ikaros-deficient mice*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(1): p. 209-20.
71. Ross, J., et al., *GATA-1 utilizes Ikaros and polycomb repressive complex 2 to suppress Hes1 and to promote erythropoiesis*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(18): p. 3624-38.
72. Bigas, A., A. Robert-Moreno, and L. Espinosa, *The Notch pathway in the developing hematopoietic system*. Int J Dev Biol, 2010. **54**(6-7): p. 1175-88.
73. Robert-Moreno, A., et al., *The notch pathway positively regulates programmed cell death during erythroid differentiation*. Leukemia, 2007. **21**(7): p. 1496-503.
74. Bernstein, B.E., et al., *A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells*. Cell, 2006. **125**(2): p. 315-26.
75. Voigt, P., W.W. Tee, and D. Reinberg, *A double take on bivalent promoters*. Genes Dev, 2013. **27**(12): p. 1318-38.
76. Bottardi, S., L. Mavoungou, and E. Milot, *IKAROS: a multifunctional regulator of the polymerase II transcription cycle*. Trends Genet, 2015. **31**(9): p. 500-8.
77. Bottardi, S., et al., *The IKAROS interaction with a complex including chromatin remodeling and transcription elongation activities is required for hematopoiesis*. PLoS Genet, 2014. **10**(12): p. e1004827.

78. Romano, G. and A. Giordano, *Role of the cyclin-dependent kinase 9-related pathway in mammalian gene expression and human diseases*. Cell Cycle, 2008. **7**(23): p. 3664-8.
79. Saunders, A., L.J. Core, and J.T. Lis, *Breaking barriers to transcription elongation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(8): p. 557-67.
80. Zhou, Q., T. Li, and D.H. Price, *RNA polymerase II elongation control*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 119-43.
81. Krueger, B.J., et al., *The mechanism of release of P-TEFb and HEXIM1 from the 7SK snRNP by viral and cellular activators includes a conformational change in 7SK*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12335.
82. Li, Q., et al., *Analysis of the large inactive P-TEFb complex indicates that it contains one 7SK molecule, a dimer of HEXIM1 or HEXIM2, and two P-TEFb molecules containing Cdk9 phosphorylated at threonine 186*. J Biol Chem, 2005. **280**(31): p. 28819-26.
83. Michels, A.A., et al., *Binding of the 7SK snRNA turns the HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9/cyclin T) inhibitor*. EMBO J, 2004. **23**(13): p. 2608-19.
84. Yik, J.H., et al., *Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA*. Mol Cell, 2003. **12**(4): p. 971-82.
85. Chen, R., et al., *PP2B and PP1alpha cooperatively disrupt 7SK snRNP to release P-TEFb for transcription in response to Ca²⁺ signaling*. Genes Dev, 2008. **22**(10): p. 1356-68.

86. Diribarne, G. and O. Bensaude, *7SK RNA, a non-coding RNA regulating P-TEFb, a general transcription factor*. RNA Biol, 2009. **6**(2): p. 122-8.
87. Popescu, M., et al., *Ikaros stability and pericentromeric localization are regulated by protein phosphatase 1*. J Biol Chem, 2009. **284**(20): p. 13869-80.
88. Orphanides, G., et al., *FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes*. Cell, 1998. **92**(1): p. 105-16.
89. Venkatesh, S., et al., *Set2 methylation of histone H3 lysine 36 suppresses histone exchange on transcribed genes*. Nature, 2012. **489**(7416): p. 452-5.
90. Carrozza, M.J., et al., *Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription*. Cell, 2005. **123**(4): p. 581-92.
91. Li, B., et al., *Infrequently transcribed long genes depend on the Set2/Rpd3S pathway for accurate transcription*. Genes Dev, 2007. **21**(11): p. 1422-30.
92. Liu, J., et al., *Dynamics of RNA Polymerase II Pausing and Bivalent Histone H3 Methylation during Neuronal Differentiation in Brain Development*. Cell Rep, 2017. **20**(6): p. 1307-1318.
93. Van Dessel, N., et al., *The phosphatase interactor NIPPI1 regulates the occupancy of the histone methyltransferase EZH2 at Polycomb targets*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(21): p. 7500-12.

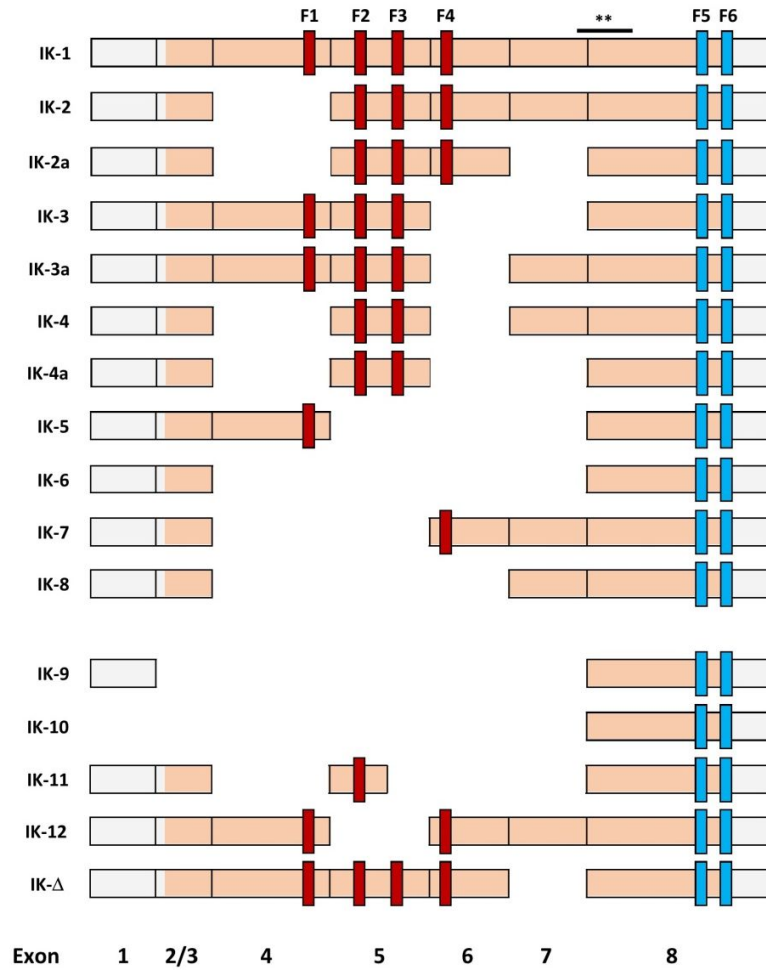


FIGURE 1: Distribution of the IKAROS isoforms

IKAROS isoforms are represented from IK-1 to IK-12. The functional isoforms (long isoforms) are listed from IK-1 to IK-3a and the dominant-negative ones (short isoforms) are listed from IK-4 to IK-12. The IK-Δ isoform lacks exon 7, which impedes interaction with PP1 phosphatase. IKAROS isoforms are represented with exons (each exon is separated with black vertical bars and indicated below) and the coding region is highlighted in light pink (from exon 2 to middle exon 8). IKAROS contains two zinc-finger motifs: at N-terminus the four zing-fingers (red large bars; F1 to F4) support sequence-specific DNA-binding, and at C-terminus the two zing-fingers (blue large bars; F5 and F6) are required for oligomerization with self and other family members. The double asterisk (**), partially covering exon 7 and 8, indicates the bipartite transactivation domain of IKAROS.

1.3. Problématique

L'importance biologique des facteurs IKAROS et NOTCH a pu être décrite avec attention dans le premier chapitre de l'introduction portant sur l'hématopoïèse. De façon intéressante, certains travaux ont permis d'établir un lien biologique entre ces deux facteurs dans l'hématopoïèse. En effet, ces deux régulateurs, essentiels au développement lymphocytaire T, possèdent un lien réciproque, mis en avant par les articles publiés par le laboratoire de Susan Winandy et Susan Chan en 2008 (64-66). IKAROS a été décrit comme régulateur direct de certains gènes cibles de la voie NOTCH comme *Hes1* (64, 66), *Deltex1*, *pTa*, *Gata3* et *Runx1* (65).

IKAROS, par lui-même, est capable de réguler un certain nombre de ses gènes de différenciation T mais est aussi capable de contrôler les gènes de différenciation ciblés par NOTCH (64-66). Son action est aussi étendue aux progéniteurs érythroïdes, dans lesquels IKAROS participe activement à l'inhibition du gène *Hes1* afin de promouvoir la différenciation cellulaire dans cette voie (67). Ces affirmations sont complétées par la publication de données démontrant qu'IKAROS est aussi capable d'empêcher le développement mégacaryocytaire induit par NOTCH en réprimant un répertoire de gènes cibles comme *Hes1*, *Nrarp*, *Cdkn1a* ou encore *c-Kit* (68).

IKAROS a la capacité de réprimer mais aussi d'activer la transcription des gènes en amenant un bagage adapté à la chromatine. On a pu voir dans l'introduction (revue de littérature) l'importance d'IKAROS dans la mise en place de ce bagage sur le *locus* de la β -globine. Sa capacité à se lier à la fois à un complexe remodeleur activateur (BAF) et répresseur (NuRD)

démontre la flexibilité de ce suppresseur de tumeur afin de répondre rapidement aux besoins développementaux.

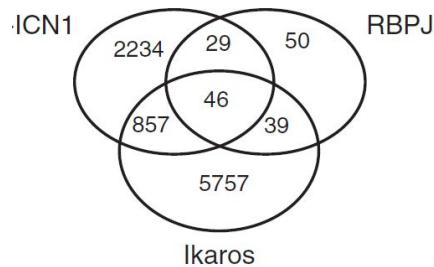


Figure 5. Diagramme de Venn représentant les régions enrichies par NICD, IKAROS et RBPJ.

(Adapté de la référence (69))

Les ChIP-seq ont été réalisés sur les cellules T29 et analysés en utilisant le génome mm9 murin. 2234 régions sont enrichies par NICD (noté « ICN1 » dans la figure), 5757 par IKAROS et 50 par RBPJ. 857 de ces régions sont communes à NICD et IKAROS tandis que 80% des régions enrichies par RBPJ sont aussi communes à IKAROS.

La voie NOTCH est finement régulée à chaque stade de différenciation (notamment cellules souches hématopoïétiques, DN1 à DN4, DP, CD4, CD8 mais aussi à l’embranchement érythro-mégacaryocytaire) et nécessite une régulation ordonnée et efficace afin d’éviter tout retard ou désordre dans le développement des différents lignages (70).

En 2014, Geimer Le Lay A-S et al. (69) ont réalisé un transcriptome sur des cellules T29 et observé que 857 régions étaient enrichies à la fois par NICD et IKAROS et que 80 % des régions enrichies par RBPJ étaient aussi occupées par IKAROS (Figure 5). Les auteurs

concluent alors qu'IKAROS est un important régulateur des gènes cibles de la voie NOTCH et que son contrôle permet d'accompagner NOTCH au cours du développement.

L'équipe du docteur Stephen T. Smale met en avant en 2015 (71) différents groupes de gènes, témoignant chacun d'un motif d'expression particulier, selon la présence ou l'absence d'IKAROS et l'activation ou non de NOTCH au cours du développement des cellules T (Figure 6). De façon intéressante, parmi les gènes répondant à l'activation de la voie NOTCH (GFP+), les gènes du groupe E3 sont surexprimés en absence d'IKAROS (absence du doigt de zinc 4=Ikzf1^{ΔF4/ΔF4}). Dans le cas contraire, la perte de fonction d'IKAROS peut aussi entraîner une diminution de l'expression bien que la voie NOTCH soit toujours activée (voir groupe E5).

Certaines études ont permis de dénouer en partie les interrogations quant aux mécanismes employés par IKAROS pour réguler ces gènes. Dans les cellules T (DN), IKAROS utilise le complexe PRC2 pour réprimer un ensemble de gènes (72). Dans les pro-érythroblastes, IKAROS participe au recrutement du NuRD et du PRC2 pour réprimer *Hes1* et induire la différenciation (67) (voir chapitre sur le complexe NuRD).

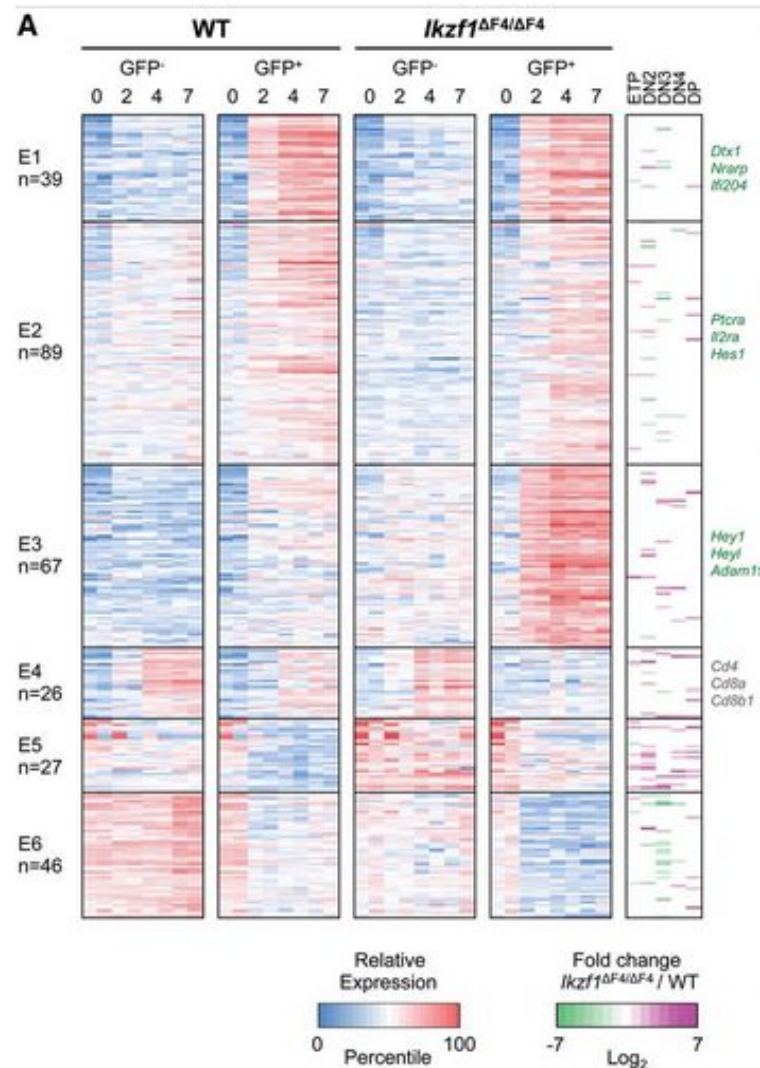


Figure 6. Implication du facteur IKAROS dans la régulation des gènes cibles de la voie NOTCH.

(Adapté de la référence (71))

Le graphique reporte les données d'expression des gènes ciblés par NOTCH et influencés par IKAROS. Les cellules progénitrices T (CD4⁻ CD8⁻) utilisées proviennent de souris dont l'exon 6 du gène *Ikzf1* a été délété (*Ikzf1*^{ΔF4/ΔF4}). L'expression constitutive de NOTCH a été obtenue en incorporant par transduction rétrovirale le fragment NICD couplé à la GFP dans les cellules T WT

et $Ikzf1^{\Delta F4/\Delta F4}$. Les cellules sont ensuite mises en culture pendant sept jours dans des conditions favorables à la différenciation. L'expression des gènes est analysée pour chacune des conditions testées et pour différents stades de différenciation T (à 0-2-4-7 jours). Le comportement transcriptionnel des gènes vis-à-vis de l'activation de NOTCH et d'IKAROS a été classifié et répertorié selon six grands groupes (E1 à E6). Le panel de droite présente quant à lui l'expression différentielle des gènes entre les cellules T $Ikzf1^{\Delta F4/\Delta F4}$ et WT à des stades connus de différenciation lymphoïde T. Les expressions relatives ont été ordonnées en percentile (de 0/bleu à 100/rouge) et en log2 (de -7/vert à +7/violet) pour le panel de droite.

1.4. Hypothèse d'étude

Une fraction importante d'IKAROS se retrouve avec le complexe de remodelage de la chromatine NuRD. Il peut aussi interagir avec le complexe de remodelage de la chromatine BAF. Ces complexes peuvent se retrouver ensemble à des gènes cibles d'IKAROS. La dualité de ces complexes pourrait être requise dans l'activation et la répression génique imposée par IKAROS à ces gènes. Étant donné qu'IKAROS peut être retrouvé dans un contexte de répression mais aussi d'activation, nous avons émis l'hypothèse qu'IKAROS requière NuRD et BAF pour représenter une plateforme solide afin d'optimiser le recrutement de facteurs d'activation ou de répression transcriptionnelle.

De plus, la capacité du NuRD à reconnaître les cytosines méthylées (par MBD2) et hydroxyméthylées (par MBD3) étend la régulation potentielle par IKAROS à la méthylation de l'ADN des gènes cibles de NOTCH.

IKAROS pourrait alors être un pilier central dans la régulation dynamique des gènes de NOTCH en y recrutant très rapidement les complexes remodeleurs, les complexes enzymatiques et la méthylation adaptée à l'environnement cellulaire à un moment précis.

Le manque de publications concernant la régulation transcriptionnelle par le facteur IKAROS dans les cellules érythroïdes a largement influencé notre hypothèse de recherche. Le facteur IKAROS, bien que moins exprimé dans les cellules du lignage myélo-érythroïde, nécessite d'y être plus amplement étudié afin d'élucider la raison pour laquelle la dérégulation d'IKAROS y est importante.

1.5. Objectifs

1.5.1. Objectif 1

Le premier objectif de ma thèse est de comprendre comment IKAROS peut contrôler de façon dynamique l'expression transcriptionnelle des gènes cibles de la voie NOTCH dans les cellules érythroïdes. On caractérisera dans un premier temps les différents patrons d'expression de ces gènes dans des cellules érythroïdes invalidées pour IKAROS. L'activation de NOTCH nous permettra ensuite de déterminer quels sont les complexes impliqués dans la régulation des gènes par IKAROS.

1.5.2 Objectif 2

Le second objectif de cette étude est de déterminer le rôle du facteur IKAROS dans la mise en place d'une déméthylation active des gènes cibles de la voie NOTCH. Pour cela, il est important de caractériser des gènes de NOTCH ciblés par IKAROS et par ce type de déméthylation, pour ensuite pouvoir caractériser les relations biologiques directes pouvant exister entre IKAROS et les facteurs responsables de ce phénomène.

PARTIE II : Matériels et Méthodes

2.1. Modèles

2.1.1. Souris

Le modèle murin employé pour les expériences nécessitant l'usage de foies fœtaux est de type BALB/c. Le modèle utilisé est caractérisé par la délétion de la partie c-terminale du gène *Ikzf1*, qui résulte en une instabilité protéique et l'absence de la protéine IKAROS dans tous les tissus murins (les embryons mutés pour IKAROS sont appelés Ik^{-/-} ou Ik^{null} dans la présentation des résultats) (73). L'accouplement est accompli entre une femelle et un mâle hétérozygote (Ik^{+/-} ou Ik^{HTZ}) âgés d'au moins huit semaines postnatales. Au bout de 14.5 jours post-coïtal (E14.5), la femelle est sacrifiée par dislocation cérébrale (pour diminuer considérablement les effets biologiques du stress lié à la mort de l'animal) et les embryons sont récupérés par acte chirurgical puis placés dans du PBS 1X stérile.

À ce stade, tous les embryons (Ik^{WT}, Ik^{HTZ} et Ik^{NULL}) sont récupérés et on en dénombre environ neuf à quatorze par portée. Chaque embryon est libéré de son sac vitellin, décapité, puis exempté de son foie, facilement reconnaissable par sa couleur vive rouge. Chaque foie fœtal est méticuleusement débarrassé d'éventuels tissus non spécifiques au foie. Le foie fœtal est facile à isoler et les cellules sont facilement dissociables; chaque foie retiré est placé dans un nouveau tube 1.5mL contenant 200 µL de milieu IMDM (pour « Iscove's Modified Dulbecco's Medium ») (Gibco)/10% FBS (pour « Fetal Bovine Serum ») (Sigma) puis écrasé mécaniquement à l'aide d'une pipette avec laquelle le foie est resuspendu. Les foies fœtaux sont à présent prêts pour être génotypés puis être utilisés pour diverses expériences.

Note: les expériences sur animaux sont certifiées être conduites en accord avec les lignes directrices du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA) et approuvées par le

Comité de Protection des Animaux (CPA) de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont. Par ailleurs, chaque utilisateur est tenu d'obtenir un certificat en expérimentation animale avant toute expérience sur animaux.

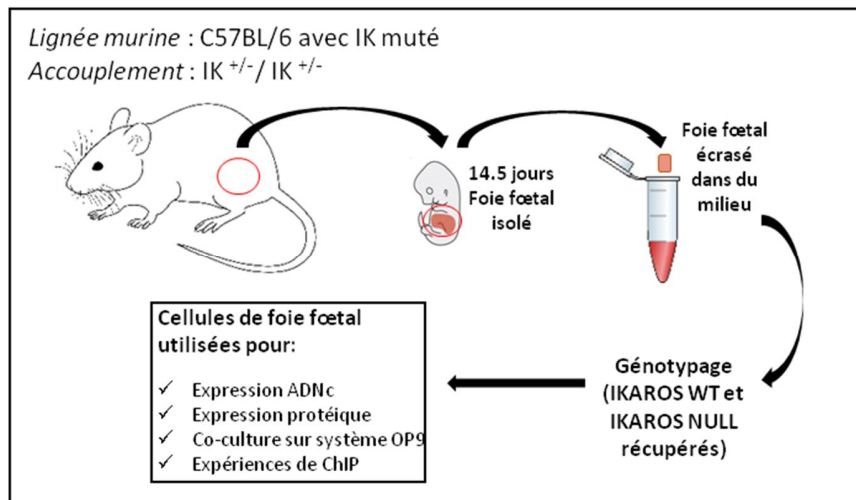


Figure 7. Représentation schématique de l'extraction des cellules érythroïdes à partir de foie fœtal murin.

2.1.1.1. Génotypage des foies fœtaux murins

Pour procéder aux expériences sur foie fœtal Ik^{WT} ou Ik^{NULL}, un génotypage doit être effectué. Pour cela, dans un nouveau tube 1.5 mL, 20 µL de chaque foie fœtal resuspendu sont ajoutés à 100 µL de réactif DNAzol® (Invitrogen) et 50 µL d'éthanol 100 %. L'ensemble est secoué vigoureusement de façon à libérer l'ADN génomique. L'ADN est centrifugé à 13000 rpm pendant 5 minutes puis le surnageant est retiré délicatement. 100 µL d'éthanol à 70 % sont ajoutés avant de vortexer et centrifuger à nouveau à 13000 rpm pendant 5 minutes. Cette étape est renouvelée une fois. Le surnageant est ensuite retiré et les tubes sont laissés ouverts 5

minutes pour faire évaporer l'excédent de solvant. L'ADN est resuspendu dans 50 µL d'H₂O dépourvue d'ARNase afin de procéder au génotypage.

Pour le génotypage, chaque tube (foie) doit contenir :

- 2.5 µL de tampon PCR+MgCl₂
- 0.5 µL d'amorces IK.3 (voir tableau 1; dilution à ¼ de chaque amorce)
- 0.5 µL de dNTP
- 0.25 µL de Taq Polymérase
- 16.75 µL H₂O dépourvue d'ARNase
- 5 µL d'ADN de foie fœtal

Note: les réactifs de la PCR proviennent tous de la compagnie Thermo-Fisher ; trois contrôles positifs (WT, HTZ et NULL) et un contrôle négatif (H₂O) sont inclus au génotypage.

| Nom de l'amorce | Détails | Volume pour amorces IK.3 (+H ₂ O qsp 100 µL) |
|-----------------|--------------------------|---|
| PCR27C | GGGCCTTTGGGGACATCGAAGGTC | 25 µL |
| PR2.3 | AGCAGAAACAGGAAGCAGGA | 25 µL |
| NEO-1 | CCAGCCTCTGAGCCCAGAAAGCGA | 25 µL |

Tableau 1. Amorces IK.3 utilisées pour la PCR du génotypage des foies fœtaux murins

Le génotypage peut ensuite être réalisé par une machine PCR (pour « Polymerase Chain Reaction ») qui va amplifier les fragments d'ADN correspondant aux amorces IK.3 (43 cycles) et seront migrés sur un gel d'agarose 2 % (1/10000 bromure d'éthidium) dans une

cuve d'électrophorèse. On obtient alors deux fragments différents : I_k^{WT} (fragment long), I_k^{NULL} (fragment court) et I_k^{HTZ} (fragment long et fragment court ensemble).

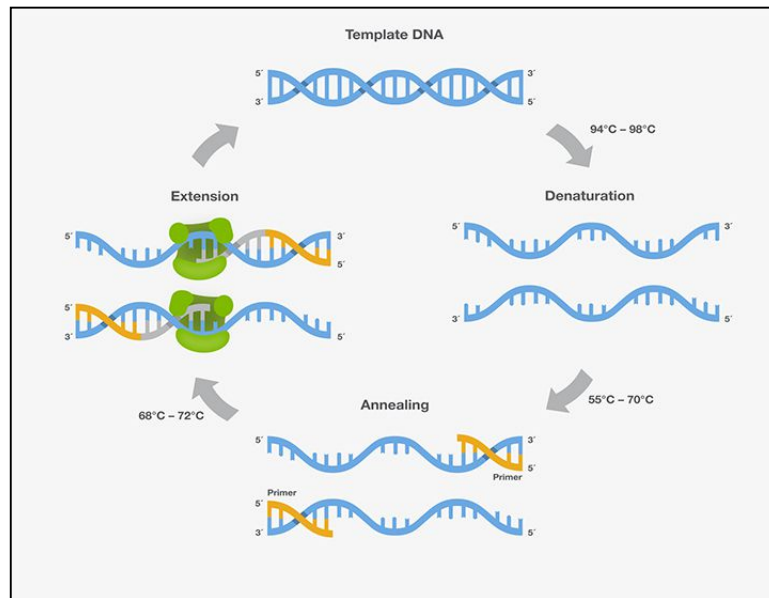


Figure 8. Représentation d'un cycle de PCR : température et fonction associée.

(Adapté de la référence (74))

2.1.2. Lignée cellulaire MEL (Mouse ErythroLeukemia)

La lignée MEL (pour « Mouse Erythro-Leukemia ») est une lignée utilisée pour remplacer les cellules érythroïdes des foies fœtaux à E14.5 jours. En effet, le stade de différenciation des cellules MEL équivaut à celui des cellules érythroïdes de souris utilisées. Les cellules sont maintenues dans du milieu RPMI (pour « Roswell Park Memorial Institute medium » de Thermo-Fisher) supplémenté de 10 % FBS et d'une solution de pénicilline/streptomycine dans un incubateur à $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{ CO}_2$.

2.2. Préparation et analyse protéique

2.2.1. Extraction nucléaire

L'extrait nucléaire est réalisé sur les cellules de foies fœtaux Ik^{WT}, Ik^{NULL} et sur les cellules MEL, avant toute expérience d'immunoprécipitation. Par immunoprécipitation, environ soixante millions de cellules de foies fœtaux ou MEL sont requises pour l'extrait. On procède tout d'abord à la lyse des cellules en les lavant deux fois avec du PBS 1X puis en reprenant le culot dans 6 mL de tampon hypotonique froid (10 mM Tris pH 7.3 ; 10 mM KCL; 1.5 mM MgCl₂) fraîchement complété par 10 mM de β-Mercaptoéthanol et 0.5 mM de Fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF). La suspension obtenue est transférée dans un homogénéiseur de Dounce et le piston doit coulisser entre vingt et trente fois pour faire éclater mécaniquement les cellules. Le résultat est observé sur une lame de microscopie avant de transférer les cellules lysées dans nouveau tube 1.5 mL froid, complété par du tampon hypotonique froid. L'ensemble est centrifugé à 3900 rpm pendant 15 minutes à 4°C.

Le surnageant est retiré et on procède à l'extraction du noyau en ajoutant l'équivalent de trois fois le volume du culot par un premier tampon d'extraction (50 mM Tris pH 7.3 ; 5 mM EDTA ; 0.5 % NP-40 ; 300 mM NaCl), fraîchement complété par 10 mM de β-Mercaptoéthanol, 0.5 mM de PMSF et 1X d'antiprotéase (Sigma #P8340). Après une incubation de 30 minutes sur glace, l'extrait est centrifugé à 14000 rpm à 4°C pendant 20 minutes pour se débarrasser de la chromatine. Le surnageant (contenant l'extrait nucléaire) est ensuite additionné de son volume par un tampon d'extraction/dilution (50 mM Tris pH 7.3 ; 5 mM EDTA ; 0.5 % NP-40), fraîchement complété par 10 mM de β-Mercaptoéthanol, 0.5 mM de PMSF et 1X d'antiprotéase. L'extrait nucléaire est directement utilisé pour procéder à

l'immunoprécipitation ou congelé rapidement sur glace sèche puis placé à -80°C pour un stockage plus long.

2.2.2. Immunoprécipitation de protéines (IP)

L'IP est une méthode permettant de déterminer les interactions protéine-protéine existant dans l'environnement cellulaire. Bien que l'IP soit une méthode très efficace pour déterminer ces interactions, elle ne discrimine pas les relations directes des relations indirectes (dans un même complexe par exemple). L'IP peut être réalisée sur du matériel cellulaire entier contenant le cytoplasme, la chromatine et le noyau ou bien sur du matériel nucléaire exempt de la chromatine et du cytoplasme (détaillé ci-haut).

- Pour une IP sur extrait nucléaire, celui-ci est centrifugé 10 minutes à 13000 rpm de manière à éliminer les derniers déchets non nucléaires (retrouvés dans le culot).

- Pour une IP sur extrait cellulaire entier, environ quinze millions de cellules par IP sont récupérées, lavées et centrifugées à 1300 rpm pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite lysées pendant 20 minutes dans la glace avec un tampon contenant du SDS (pour « sodium dodecyl sulfate »), puis centrifugées à 13000 rpm pendant 10 minutes pour se débarrasser des déchets cellulaires.

Un input de 20 µL est mis de côté et l'échantillon d'extrait nucléaire ou d'extrait cellulaire entier restant est ensuite agité toute la nuit à 4°C avec l'anticorps approprié et du tampon d'IP (50 mM Tris pH7.5 ; 10 % Glycérol ; 0.2 mM EDTA; 145 mM KCl ; 5 mM MgCl₂ ; 0.5 % NP-40) fraîchement complété par 10 mM de β-Mercaptoéthanol, 0.5 mM de PMSF et 1X d'antiprotéase, qsp 1.5 mL. L'anticorps va ainsi pouvoir reconnaître la protéine ciblée.

Le lendemain, des billes de protéines G couplées à l'agarose sont ajoutées afin de reconnaître les anticorps mis à incuber toute la nuit. Les billes sont mises à agiter pendant 4 heures à 4°C puis centrifugées et lavées quatre fois avec 1 mL de tampon d'IP. Chaque échantillon est ensuite additionné de 30 µL de solution « loading buffer » contenant du SDS (1 mM PMSF, 150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 6.8, 10 % glycérol, 2 % SDS, 0.1 % bleu de bromophénol et 2.5 % β-mercaptoéthanol) (ajouter seulement 20 µL pour l'input et non 30), puis chauffé à 95°C pendant 10 minutes avant d'être chargé sur un gel 2 % d'agarose en cuve d'électrophorèse pour procéder à l'analyse protéique de l'IP (décrite ci-après).

Note: Chaque échantillon testé avec un anticorps particulier doit obligatoirement être testé avec un contrôle négatif contenant des IgG de même origine (souris, lapin, chèvre, etc.) que l'anticorps en question.

2.2.3. Western Blot (Immunobuvardage de type Western)

La quantification protéique s'effectue sur les MEL et sur du matériel de foie fœtal seul ou après co-culture. Deux à trois millions de cellules sont récupérés par condition et centrifugés à 1300 rpm pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite lavées une fois au PBS et le culot est resuspendu dans 150 µL de solution « loading buffer » contenant du SDS (détail décrit plus haut). Le tout est par la suite soniqué, chauffé à 95°C pendant 10 minutes et migré sur un gel SDS-polyacrylamide (de 8 à 15 % selon la taille des protéines que l'on veut récupérer) en cuve d'électrophorèse (SDS-PAGE). Les paramètres utilisés pour la migration sont de 120 volts pendant 1 heure et 30 minutes. Le gel est ensuite transféré sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) et maintenu en sandwich dans une cuve. Les paramètres utilisés pour le transfert sont de 100 volts pendant 1 heure et 30 minutes. Les protéines sont à présent sur la membrane

de nitrocellulose qui est mise à incuber pendant 1 heure à température ambiante dans du TBS+1X Tween®20 (TBS-T) +5 % lait. L'anticorps primaire spécifique à la protéine voulue peut à présent être hybridé sur la membrane et incubé à 4°C toute la nuit (indiqué dans le tableau 3). Si la quantification de plusieurs protéines est requise, la membrane sera alors coupée de part et d'autre de chaque poids moléculaire désiré. La provenance et la dilution de chaque anticorps utilisé sont inscrites dans le tableau suivant.

Le lendemain, la membrane est lavée trois fois au TBS-T, incubée avec l'anticorps secondaire correspondant puis relavée trois fois au TBS-T. Les protéines peuvent à ce stade être révélées par de l'ECL (Clarity Western ECL de Bio-Rad) en plaçant la membrane dans l'analyseur d'images Fujifilm® LAS-4000.

2.3. Préparation et analyse génique

2.3.1. Extraction de l'ARNm

La quantification des ARNm s'effectue sur du matériel de foie fœtal seul ou après co-culture. Un à trois millions de cellules sont récupérées par condition et centrifugées à 1300 rpm pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite lavées une fois au PBS et le culot est resuspendu dans 1 mL de réactif TRIzol® (Ambion-life Technologies). En attendant l'extraction des ARNm, les tubes contenant le TRIzol® sont conservés à -80°C. Le jour de l'expérience, les tubes sont décongelés et additionnés de 200 µL (pour 1mL) de chloroforme puis secoués vigoureusement avant d'être centrifugés à 12000 g pendant 15 minutes. Deux phases apparaissent nettement : la phase supérieure est récupérée délicatement dans un nouveau tube contenant 500 µL d'isopropanol. Les tubes sont secoués et laissés à température ambiante

pendant 10 minutes avant d'être à nouveau centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est retiré et 1 mL d'éthanol 70 % est ajouté. L'ensemble est vortexé et centrifugé à 7500 g pendant 5 minutes. Le surnageant est retiré et le culot d'ARNm est laissé à l'air libre pour permettre au solvant de s'évaporer totalement. On ajoute 30 μ L d'H₂O dépourvue d'ARNase par tube dont 2 μ L seront réservés au dosage sur une machine Tecan® (LifeSciences).

2.3.2. Transcription inverse

Après dosage, 1 μ g d'ARNm (qsp 8 μ L H₂O) est transcrit en ADNc en utilisant le SuperMix de synthèse d'ADNc « All-in-One » de chez Bimake. Avant la transcription inverse, l'ARN doit être préalablement débarrassé de toute contamination d'ADN. Par tube, le traitement est initié en ajoutant 1 μ L d'ADNase pour 1 μ L de tampon pour ADNase et incubé à 37 °C pendant 30 minutes, puis stoppé par l'ajout d'1 μ L d'EDTA à 50 mM avec incubation à 65°C pendant 10 minutes. Les tubes sont mis sur la glace puis centrifugés brièvement avant d'entamer l'étape de transcription inverse. Pour débiter, 2 μ L de SuperMix sont ajoutés à l'ARN qui est ensuite incubé à 42°C pendant 1 heure. La réaction est finalisée en augmentant la température à 85°C pendant 5 minutes. Chaque réaction est complétée à 20 μ L d'H₂O. Les ARN sont à présent transcrits en ADNc et maintenus à -20°C en attendant leur utilisation en PCR quantitative.

2.3.3. PCR quantitative

De façon à quantifier les ARNm transcrits dans une cellule à un temps donné, avec ou sans traitement particulier, on procède à la production de son ADN complémentaire (par la

méthode de transcription inverse détaillée ci-dessus) qui est lui-même quantifié par une machine à PCR quantitative. Elle est capable de mesurer la quantité initiale d'ADN dans le tube en calculant le nombre d'amplicons (déterminés par les paires d'amorces) produits sur le total de cycles de la réaction. On utilise une plaque à qPCR de 96 puits dans lesquels on ajoute dans chacun d'entre eux : 1 µL d'ADNc, 12.6 µL d'H₂O miliQ® propre, 5 µL de SYBR Green (Biotool), 0.2 µL de Rox2 (Biotool) et 0.2 µL de paires d'amorces (tableau 2). On utilise l'*Actine* comme gène de ménage pour calculer les niveaux d'expression relatifs des gènes étudiés.

La plaque est ensuite placée dans une machine à qPCR Applied Biosystems (Thermo-Fisher) puis analysée. Le résultat pour chaque condition a été calculé en fonction du contrôle interne *Actine* et le résultat est toujours exprimé en « Fold Change » en fonction de la condition contrôle (non traité, WT ou temps 0). Pour obtenir les niveaux d'expression relatifs en fonction du contrôle *Actine* et de la condition contrôle, on utilise la méthode de Pfaffl :

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gène étudié}} - Ct_{\text{gène de ménage}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon1}} - \Delta Ct_{\text{condition contrôle}}$$

$$QR = \text{Quantification Relative} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

La QR va ainsi donner le « Fold Change » qu'aura chaque échantillon en fonction de la condition contrôle dont la valeur est fixée à 1.

| Gène | Amorce sens (5') | Amorce anti-sens (3') |
|---------------|--------------------------|------------------------------|
| <i>Hes1</i> | ACACCGGACAAACCAAAGAC | ATGCCGGGAGCTATCTTTCT |
| <i>HeyL</i> | TCCTAGCCAGAGATTCAGTGTCAC | GTTTGTCTGCAACACCCTAGAGTG |
| <i>Hey2</i> | TGAGAAGACTAGTGCCAACAGC | TGGGCATCAAAGTAGCCTTTA |
| <i>Actine</i> | ATCGTGGGCCGCCCTAGGCACCA | TCCATGTCTGTCCTCCAGTTGGTAACAA |

Tableau 2. Paires d'amorces utilisées pour quantifier l'ARN par qPCR après transcription inverse.

2.4. Immunoprécipitation de la chromatine

2.4.1. Protocole classique

L'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) représente une méthode par laquelle il est possible de quantifier relativement l'enrichissement de protéines ou marques épigénétiques à un endroit déterminé du génome. Pour cela, on compare les valeurs obtenues par qPCR avec un contrôle interne négatif pour lequel un très faible enrichissement de la protéine est détecté.

Pour chaque expérience de ChIP, un million de cellules de foies fœtaux Ik^{WT} ou Ik^{NULL} est nécessaire par protéine et une marge d'un million de cellules y est ajoutée (par exemple, si trois anticorps différents sont requis, quatre millions de cellules seront récupérés pour l'expérience). Ces cellules sont lavées une fois au PBS puis toutes les protéines liées à l'ADN sont immobilisées dans 963 µL de PBS 1X + 9.73 µL d'EGS 150 mM pendant 30 minutes (avec agitation sous protection de la lumière). Les cellules subissent une fixation complémentaire pendant 5 minutes avec 1 % de formaldéhyde. La réaction est stoppée par de la glycine pour au moins 10 minutes et les cellules sont centrifugées puis resuspendues dans 300 µL de tampon SDS de lyse à pH 7.6. Les cellules sont ensuite lysées pendant 10 minutes

puis soniquées (sonicateur de chez Branson-Digital) de façon à obtenir des fragments d'ADN génomique de 300 à 500 paires de bases (longueur des fragments vérifiée par migration sur gel d'agarose 2 % + BET ; Figure 9). Les fragments sont centrifugés pendant 10 minutes à 13000 rpm puis dilués dans 2.7 mL de tampon de dilution (+1/100 PMSF et 1/1000 aprotinine).

Une étape de prélavage est requise pour débarrasser les billes des protéines aspécifiques et qui pourraient affecter négativement l'IP.

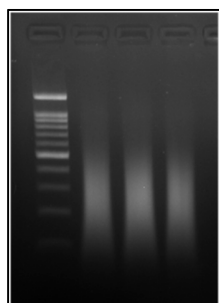


Figure 9. Exemple de gel d'agarose après sonication des échantillons pour l'expérience de ChIP.

Pour cela, on ajoute 20 μL de protéines A conjuguées à des billes Sépharose (billes préalablement préparées et bloquées) aux 3 mL de tampon + ADN puis on laisse agiter à 4°C pendant 30 minutes. Le contenu de chaque tube est ensuite centrifugé pour se débarrasser des billes puis réparti selon le nombre d'anticorps à tester : 100 μL d'input sont récupérés puis 2.8 mL de tampon + ADN sont partagés selon le nombre d'anticorps (par exemple, si trois anticorps sont testés, on consacrera $2800/3=933$ μL pour chaque anticorps). Chaque tube est incubé avec 2 μg d'anticorps approprié à 4°C toute la nuit. La provenance de chaque anticorps utilisé est spécifiée dans le tableau 3.

| Anticorps | Compagnie | Référence |
|--------------------|------------------|------------------|
| Anti-TET1 | Milipore | #09-872 |
| Anti-IKAROS | Santa Cruz | #sc-13039 |
| Anti-5hmC | Active Motif | #39769 |
| Anti-APE1 | Abcam | #Ab92744 |

Tableau 3. Liste des anticorps utilisés avec provenance associée

Le lendemain, un volume de 25 μL de protéines A conjuguées à des billes Sépharose (billes préalablement préparées et bloquées) est ajouté à chaque tube (hormis les inputs) et mis à agiter à 4°C pendant 1 heure. Après centrifugation des tubes, un surnageant de 500 μL par condition est récupéré afin de vérifier ultérieurement la taille des fragments en PCR (Figure 21). Ce tube subira les mêmes traitements que les autres échantillons, en plus de l'input auquel on ajoute 400 μL de tampon de dilution.

Les échantillons contenant des billes subissent ensuite plusieurs séries de lavages. En effet, les billes sont tout d'abord centrifugées à 3500 rpm pendant 1 minute et 15 secondes, dépourvues de leur surnageant, additionnées de tampon pauvre en NaCl, agitées délicatement pendant 1 minute puis recentrifugées. Ce cycle est répété avec les tampons « riche en NaCl », « LiCL » et « TE » pour deux cycles (le contenu de ces solutions est détaillé dans le tableau 5). Les billes sont ensuite éluées avec une solution de bicarbonate de sodium et de SDS pendant 15 minutes, deux fois, afin de récupérer les fragments ADN/protéine d'intérêt dans la solution. Pour délier l'ensemble protéine/anticorps/ADN, on ajoute 20 μL de NaCL 5M à chaque tube et on incube pendant 4 heures à 65°C (incluant l'input et le surnageant). Cette étape est complétée par la digestion des protéines en ajoutant une solution contenant de la protéinase-K

(20 µL Tris pH6.5 1M, 10 µL EDTA 0.5 M et 2 µL protéinase-K à 10mg/mL) et en laissant agir 1 heure à 55°C.

L'ADN est ensuite extrait en ajoutant 500 µL de phénol-chloroforme dans chaque tube, centrifugé à 13000 rpm pendant 5 minutes puis mélangé (la phase supérieure contient l'ADN) à 1 mL d'éthanol 100 % + 3 µL d'ARNt à 1 mg/mL pour la précipitation. Après une nuit à -20°C, les échantillons sont centrifugés 30 minutes à 13000 rpm puis resuspendus dans 32 µL d'H₂O miliQ®. Les fragments d'ADN génomique sont à présent prêts pour être quantifiés par PCR quantitative selon la même méthode inscrite dans la partie 2.3.3. PCR quantitative et en utilisant les paires d'amorces du tableau 4. Le gène *Thp1* est ici utilisé comme contrôle interne.

| Gène | Région | Amorce sens (5') | Amorce anti-sens (3') |
|-------------|--------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Hes1</i> | prom | GGTAACCCACCTTTCACCT | GACCAATGAGTTTGGGCACT |
| <i>HeyL</i> | prom | TCCCACAGTGCACGTAGCTTC | GGGAGGGCAGATAGGTTTGG |
| <i>Hey2</i> | prom | TCAGCCACTCAGCAGCTTGA | ACCTGCAAGCCGTGATCTCT |
| <i>Thp1</i> | ORF | GGTGGATGGTGTGGTCACAAC | GGTCTTGACACACCAGCTTT |

prom* : région promotrice du gène

Tableau 4. Paires d'amorces utilisées pour quantifier l'ADN par qPCR après expérience de ChIP.

2.4.2. Protocole adapté à la marque 5-hmC

L'immunoprécipitation de l'hydroxyméthylation d'ADN (5-hmC) représente une méthode par laquelle il est possible de quantifier relativement l'enrichissement de cette marque à un endroit précis du génome (particulièrement au promoteur ou au TSS). Pour cela, on compare les valeurs obtenues par qPCR pour chaque échantillon en fonction de l'input correspondant (%)

input). L'expérience est réalisée sur les cellules de foies fœtaux Ik^{WT} et Ik^{NULL} et les différentes étapes détaillées ci-après sont réalisées sur un total de quatre jours:

-1er jour :

Après avoir génotypé les cellules de foie fœtal, un million et demi de cellules Ik^{WT} ou Ik^{NULL} par expérience sont lavées au PBS 1X puis reprises dans 300 µL de tampon TE et 300 µL de tampon de lyse hMeDIP (pour « hydroxymethylated-DNA Immunoprecipitation ») contenant 20 µL de protéinase à 10mg/mL. L'ensemble est incubé pendant 5 heures à 55°C puis additionné de 600 µL de phénol/chloroforme. Après agitation, les tubes sont centrifugés 5 minutes à 13000 rpm (température ambiante) puis la phase aqueuse contenant l'ADN est placée dans un nouveau tube. L'ADN est précipité toute la nuit à -20°C avec 1200 µL d'Ethanol 100 % et 45 µL de NaAc 3M.

-2ème jour :

Les tubes sont récupérés et centrifugés 30 minutes à 13000 rpm à 4°C. Le surnageant est retiré délicatement et le culot est laissé à sécher pendant 10 minutes avant d'être repris dans 400 µL de tampon TE contenant 1X d'ARNase A. L'ADN subit ensuite une sonication permettant d'obtenir des fragments de 150 à 250 paires de bases. 800 µL d'éthanol 100 %, 32 µL de NaCl 5M et 3 µL d'ARNt à 1 mg/mL sont ajoutés aux fragments avant d'être placés toute la nuit à -20°C.

-3ème jour :

Le lendemain, les tubes sont centrifugés 30 minutes à 13000 rpm à 4°C puis dépourvus de leur surnageant. Le culot est laissé à sécher 10 minutes avant d'être repris dans 450 µL de tampon TE. À ce stade, il est possible d'aller doser l'ADN récupéré pour s'assurer d'avoir 1 µg

d'ADN pour l'IP. On procède ensuite à l'étape de prélavage en ajoutant 50 µL de billes de sépharose à l'ADN que l'on agite 1 heure à 4°C. L'ensemble ADN-billes est centrifugé 1 minute à 10000 g à 4°C et le surnageant est récupéré. 50 µL de surnageant sont consacrés à l'input et le reste est récupéré pour l'IP. Les échantillons sont mis à bouillir pendant 10 minutes à 95 °C puis refroidis sur glace pendant 10 minutes. 2 µg d'anticorps anti-5hmC sont ajoutés à l'échantillon qui est ensuite placé en agitation à 4°C pendant 3 heures. 50 µL de billes Sépharose sont ajoutés puis l'échantillon est remis sous agitation à 4°C pendant 1 heure. L'ensemble est centrifugé : (i) le surnageant qui contient l'ADN non lié à l'anticorps est récupéré pour déterminer plus tard la taille des fragments, et (ii) les billes qui contiennent l'ADN lié à l'anticorps sont lavées selon le même principe qu'un ChIP (« pauvre en NaCl », « riche en NaCl », « LiCl » et « TE deux fois »). Après le dernier lavage au tampon TE, les billes sont récupérées dans 250 µL de tampon d'élution (composé de bicarbonate de sodium et de SDS) pendant 15 minutes, deux fois. Les surnageants récupérés lors des deux étapes d'élution sont rassemblés dans un même tube dans lequel on ajoute 34 µL de solution de Protéinase-K (voir plus haut la composition), en plus de l'input et du surnageant associés (contenant l'ADN non lié) qui sont tous deux additionnés d'H₂O miliQ® qsp 500 µL. Les échantillons sont incubés 1 heure à 55°C (ChIP/input/surnageant) puis additionnés d'1 mL de phénol/chloroforme. Après agitation, les tubes sont centrifugés et la phase supérieure obtenue (qui contient l'ADN) est placée dans un autre tube contenant 1 mL d'Ethanol 100 % et 3 µL d'ARNt à 1 mg/mL. Les tubes sont placés à -20°C toute la nuit.

-4ème jour :

Le dernier jour, les échantillons sont centrifugés 30 minutes à 13000 rpm à 4°C. Le culot est ensuite laissé à sécher une dernière fois pendant 10 minutes puis repris dans un volume final

de 32 μ L d'H₂O miliQ®. Les échantillons peuvent être utilisés immédiatement ou bien stockés à -20°C.

| Solution | Concentration mère | Concentration finale |
|--|---|---|
| Tampon pauvre en NaCl | SDS 10% Triton 100x EDTA 0.5M Tris HCl pH 8 1M NaCl 5M | 0.1% 1% 2mM 20mM 150mM |
| Tampon riche en NaCl | SDS 10% Triton 100x EDTA 0.5M Tris HCl pH 8 1M NaCl 5M | 0.1% 1% 2mM 20mM 500mM |
| Tampon LiCL | LiCL 2M NP40 10% Acide déoxycholique 10% EDTA 0.5M Tris HCl pH 8 1M | 0.25M 1% 1% 1mM 10mM |
| Tampon TE | EDTA 0.5M Tris HCl pH 8 1M | 1mM 10mM |
| Tampon de Lyse SDS pour ChIP classique | SDS 10% EDTA 0.5M Tris HCl pH 8 1M | 1% 10mM 50mM |
| Tampon de Lyse SDS pour ChIP 5-hmC (hMeDIP) | SDS 10% EDTA 0.5M Tris HCl pH 8 1M NaCl 5M | 1% 4mM 20mM 20mM |
| Tampon de dilution | SDS 10% Triton 100x EDTA 0.5M Tris HCl pH 8 1M NaCl 5M | 0.01% 1.1% 1.2mM 16.7mM 168.5mM |

Tableau 5. Contenu des solutions utilisées pour l'expérience de ChIP

PARTIE III : Résultats

Article I : “IKAROS is required for proper expression of NOTCH target genes upon external signaling”

L'article présenté ci-après est écrit sous la forme d'un manuscrit, prêt à être soumis très prochainement dans une revue scientifique. Les travaux inclus dans le manuscrit répondent à une question majeure posée dans l'hypothèse de cette étude, à savoir si IKAROS peut exercer une action générale sur les gènes cibles de la voie NOTCH dans les cellules érythroïdes.

IKAROS est décrit comme un facteur de transcription responsable de la répression de gènes cibles de la voie NOTCH dans les cellules lymphoïdes, myéloïdes et érythroïdes. Cependant, le mécanisme utilisé demeure nébuleux. Les gènes réprimés par IKAROS sont caractérisés par la marque H3K27me3, déposée par le complexe PRC2 dont IKAROS facilite le recrutement à la chromatine. De façon intéressante, dans les cellules érythroïdes, IKAROS est aussi capable de recruter à la chromatine des complexes remodeleurs de la chromatine tels que NuRD et SWI/SNF, suggérant qu'IKAROS pourrait alors avoir plus d'un rôle dans la régulation des gènes. La capacité attribuée à IKAROS dans la régulation des gènes cibles de NOTCH se limite pourtant à leur répression. Cependant, les connaissances actuelles définissent IKAROS comme un facteur ayant la capacité de réprimer mais aussi d'activer certains gènes. Dans cette étude, nous posons l'hypothèse qu'IKAROS, en plus de réprimer un ensemble de gènes ciblés par NOTCH, pourrait faciliter l'activation d'un autre groupe de gènes dépendant de la voie NOTCH. Pour cela, un séquençage d'ARN réalisé dans les cellules érythroïdes a permis de faire ressortir deux groupes de gènes intéressants, mettant en relief un rôle dual du facteur IKAROS dans la régulation des gènes ciblés par la voie NOTCH. Cette étude révèle, par des expériences d'immunoprécipitation et de RT-qPCR, qu'IKAROS, de concert avec le complexe

NuRD qu'il recrute, semble instaurer un état de bivalence sur ces gènes, caractérisés par la co-présence de H3K4me3 et de H3K27me3. Que les gènes ciblés par NOTCH soient réprimés par IKAROS ou bien que leur activation soit soutenue par IKAROS, la régulation semble dépendre d'un équilibre des marques H3K4me3/H3K27me3, qui est brisé quand IKAROS est muté et que NOTCH est activé anormalement.

Contribution des auteurs à l'article

| Auteurs de l'article | Contribution |
|-----------------------------|--|
| <u>Maud Lemarié</u> | Participation à la conception des expériences ; Réalisation des expériences (hormis cytométrie et séquençage d'ARN); Analyse et interprétation des résultats ; Analyse bio-informatique du séquençage d'ARN ; Participation à l'élaboration du manuscrit. |
| Lionel Mavoungou | Réalisation du séquençage d'ARN ; Réalisation de l'expérience de cytométrie en figure S2. |
| Helen Pak | Réalisation des clones scr332 et sh322 (sh IKAROS) dans les cellules G1E-ER4. |
| Eric Milot | Conception des expériences ; Analyse et interprétation des résultats ; Elaboration du manuscrit. |

IKAROS is required for proper expression of NOTCH target genes upon external signaling

Maud Lemarié^{1,2}, Lionel Mavoungou¹, Helen Pak¹ and Eric Milot^{1,2#}

¹Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center; and ²Faculty of Medicine, University of Montreal, 5415 boulevard de l'Assomption, Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4

[#]To whom correspondence should be addressed. email: e.milot.1@umontreal.ca

ABSTRACT

The tumor suppressor IKAROS can bind to multiple NOTCH target genes and promote their repression. Upon NOTCH pathway activation, IKAROS is removed from these genes and subsequently the NOTCH Intracellular Domain is recruited. However for certain NOTCH targets, chromatin binding of IKAROS is maintained upon NOTCH activation, although whether IKAROS then participates in transcriptional activation of these targets is unknown. In erythroid cells, we analyzed the combined effect of IKAROS abrogation and NOTCH pathway activation on the expression of NOTCH targets. A large number of these were either overexpressed or no longer responsive to NOTCH signaling, suggesting that IKAROS may be required for organization of a chromatin state poised for transcriptional activation of NOTCH target genes belonging to either of the aforementioned groups. Among genes overexpressed upon NOTCH activation in the absence of IKAROS are *Trp53* and *Cdkn1a*. We demonstrate that IKAROS is involved in a TP53-independent mechanism of *Cdkn1a*/P21^{WAF1/CIP1} regulation, and that abnormal regulation of *Cdkn1a* imposed by the absence of IKAROS is exacerbated upon NOTCH signaling or genotoxic stress.

INTRODUCTION

NOTCH signaling controls cell proliferation, differentiation, and apoptosis. Moreover, it is required for hematopoietic stem/progenitor cell (HS/PC) interactions with their environment (Pajcini, Speck et al. 2011). Disruption or abnormal expression of NOTCH receptors (NOTCH 1 to 4), particularly NOTCH1, affects hematopoietic cell homeostasis and is common in hematological malignancies including T-ALL (Weng, Ferrando et al. 2004, Jeannet, Mastio et

al. 2010). NOTCH signaling triggers sequential proteolytic cleavage events that promote nuclear localization of NOTCH Intracellular Domain (NICD). The nuclear NICD forms a 'ternary complex' with the transcription factor RBP-J κ (CBF1) and the coactivator Mastermind-like, thereby promoting NOTCH target gene activation. In order to induce transcriptional activation, this ternary complex also recruits co-activators including p300 (Oswald, Täuber et al. 2001). Chromatin recruitment of NICD and RBP-J κ to different target genes appears to be unstable, and requires other transcription factors to be efficiently bound (Krejci and Bray 2007). In mammalian cells different transcription factors including members of the IKZF family such IKAROS, HELIOS and AIOLOS can interact with NICD (Yatim, Benne et al. 2012). However whether such interactions could be functional and stabilize RBP-J κ -NICD at specific genes is not known.

IKAROS has been identified as an important repressor of NOTCH target genes in lymphoid, myeloid and erythroid cells (Chari and Winandy 2008, Kathrein, Chari et al. 2008, Kleinmann, Geimer Le Lay et al. 2008, Ross, Mavoungou et al. 2012, Malinge, Thiollier et al. 2013, Geimer Le Lay, Oravecz et al. 2014). Gene repression imposed by IKAROS is linked to the polycomb repressive complex 2 (PRC2) and NOTCH target genes downregulated by IKAROS are marked by the histone post-translational modification H3K27me₃, which is produced by the PRC2 enzyme EZH2. Furthermore, IKAROS was found to oppose activation of the NOTCH target genes *pT α* and *Hes1* by preventing the recruitment of RBP-J κ (Bellavia, Mecarozzi et al. 2007, Ross, Mavoungou et al. 2012). Thus, NOTCH target gene repression imposed by IKAROS is likely to be complementary to the canonical mechanism of such

repression, which is mediated by the recruitment of RBP-J κ along with various corepressors (Bray 2006).

Although less well documented, IKAROS might also participate in transcriptional activation of specific NOTCH target genes, *e.g.*, following co-recruitment with NICD to such genes (Geimer Le Lay, Oravecz et al. 2014). To other genes IKAROS has been shown to participate in both activation (Bottardi, Zmiri et al. 2011, Bottardi, Mavoungou et al. 2015) and repression (Zhang, Jackson et al. 2011, Ross, Mavoungou et al. 2012). Proteomic analyses and target gene characterization have failed to fully clarify how this transcription factor can either inhibit or promote transcriptional activation. Nonetheless, different co-factors and complexes can be associated with IKAROS on chromatin (Brown, Guest et al. 1997, Zhang, Jackson et al. 2011). The interaction between IKAROS and the Nucleosome Remodeling and Deacetylase (NuRD) complex is critical for chromatin organization of multiple gene regulatory regions in hematopoietic cells (Zhang, Jackson et al. 2011, Bottardi, Mavoungou et al. 2014). However, like IKAROS, NuRD can participate in both transcriptional activation and repression (Yoshida, Hazan et al. 2008, Miccio, Wang et al. 2010). Among IKAROS interacting partners that could positively or negatively influence gene expression is the Positive-Transcription Elongation Factor b (P-TEFb), which can be included in a larger complex with IKAROS-NuRD (Bottardi, Zmiri et al. 2011, Bottardi, Mavoungou et al. 2014). IKAROS can favor the chromatin recruitment of P-TEFb to specific genes. To promote transcription elongation, P-TEFb must be activated to release the CDK9/P-TEFb from the inactive 7SK complex. This event requires dephosphorylation of the CDK9 T-loop through the concerted action of protein phosphatase 2B and 1a (PP2B and PP1a) (Chen, Liu et al. 2008,

Nekhai, Petukhov et al. 2014). The activated CDK9/P-TEFb can phosphorylate the Pol II C-terminal domain (CTD) at Ser-2, along with the negative elongation factors NELF and DSIF (Wada, Takagi et al. 1998), that induce conformational changes allowing Pol II to enter the productive phase of transcription elongation (Peterlin and Price 2006). IKAROS interacts with CDK9 (Bottardi, Mavoungou et al. 2013, Bottardi, Mavoungou et al. 2014) and PP1 (Popescu, Gurel et al. 2009, Bottardi, Mavoungou et al. 2014) thus promoting their recruitment to specific genes in hematopoietic cells (Bottardi, Mavoungou et al. 2014). IKAROS mutants with poor affinity for PP1 no longer favor proficient transcriptional elongation (Bottardi, Mavoungou et al. 2014), suggesting that the IKAROS-PP1 interaction promotes CDK9/P-TEFb activation and, thereby, productive transcriptional elongation. Thus, when associated with NuRD-P-TEFb, IKAROS promotes transcriptional elongation (Bottardi, Ross et al. 2009, Bottardi, Zmiri et al. 2011, Bottardi, Mavoungou et al. 2014). Alternatively, genes repressed by IKAROS are frequently characterized by H3K27me3 marks, and IKAROS-NuRD is reported to interact with the PRC2 (Ross, Mavoungou et al. 2012, Geimer Le Lay, Oravecz et al. 2014, Oravecz, Apostolov et al. 2015). In EryC, the H3K27 methyltransferase EZH2 of the PRC2 complex is required for IKAROS-dependent repression of *Notch1* and *Hes1* genes (Ross, Mavoungou et al. 2012). Thus, during both activation and repression, IKAROS can interact with different cofactors to influence specific mechanisms regulating gene expression.

Murine homozygous knockouts for IKAROS (Ik^{null}) are characterized by severe lymphopoietic defects (Wang, Nichogiannopoulou et al. 1996) and succumb to leukemia or lymphoma with 100% penetrance (Winandy, Wu et al. 1995). IKAROS controls gene expression in HS/PC and different hematopoietic lineage cells (Georgopoulos, Moore et al. 1992, Dumortier, Kirstetter et al. 2003, Bottardi, Ross et al. 2009, Yoshida, Ng et al. 2010,

Francis, Payne et al. 2011, Ferreiros-Vidal, Carroll et al. 2013, Malinge, Thiollier et al. 2013, Schwickert, Tagoh et al. 2014). Overexpression of dominant negative IKAROS isoforms frequently characterizes childhood T- and B-Acute Lymphocytic Leukemia (B- and T-ALL) (Sun, Goodman et al. 1999). Of particular interest here is the implication of IKAROS in EryC gene regulation (Bank 2006, Keys, Tallack et al. 2008, Bottardi, Ross et al. 2009, Bottardi, Zmiri et al. 2011, Ross, Mavoungou et al. 2012), along with the observation that Ik^{null} mice develop anemia due to deregulation of functional EryC homeostasis (Nichogiannopoulou, Trevisan et al. 1999, Lopez, Schoetz et al. 2002). However it remains to be determined whether the Ik^{Null} effect on EryC could be related to IKAROS regulation imposed on NOTCH target genes.

We set out to define the importance of crosstalk between IKAROS and NOTCH pathway activation in EryC. We thus compared the EryC transcriptomes of IKAROS proficient (Ik^{WT}) vs IKAROS knockout (Ik^{Null}) mouse fetal liver EryC, co-cultured with either OP9 or OP9-DL1 stroma cells (Schmitt and Zuniga-Pflucker 2002) wherein, respectively, the NOTCH pathway is activated or not. In this system, as suspected IKAROS was shown to repress multiple NOTCH target genes but, unexpectedly, appeared to be required for activation of others. The molecular characterization of different NOTCH regulated genes suggests that IKAROS and NuRD are needed to organize a bivalent chromatin state which is then poised to promote NOTCH-mediated activation of transcription. Finally, we show that IKAROS controls the expression of the NOTCH target genes *Trp53* and *Cdkn1a* encoding, respectively, TP53 and P21^{WAF1/CIP1}; moreover IKAROS, is also required for the physiological response of the aforementioned proteins to NOTCH pathway activation or genotoxic stress.

MATERIALS AND METHODS

Mouse line

The mouse model used was characterized by the deletion of the C-terminal part of IKAROS, which results in protein instability and the absence of IKAROS protein in all tissues (Ik^{Null}) (Wang, Nichogiannopoulou et al. 1996). Heterozygous male and female were bred, and 14.5 days post coitus (dpc) homozygote Ik^{WT} (IKAROS wild-type) or Ik^{Null} embryos (e14.5) were harvested and fetal liver erythroid cells were isolated. Genotyping was done with DNazol reagent (Invitrogen) to proceed with fetal liver experiments. Animal experiments were conducted in accordance with the Canadian Council on Animal Care (CCAC) guidelines and approved by the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal care committee.

Cell cultures

G1E-ER4 (GATA-1 knockout ES-derived pro-erythroblast cell line expressing an inducible GATA-1-ER protein) cells (Simon, Pevny et al. 1992, Weiss, Yu et al. 1997, Rylski, Welch et al. 2003) were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; In Vitrogen) containing 13% fetal bovine serum (FBS; Sigma), 1.7% penicillin-streptomycin (PS; Wisent), 1.8 U/ml erythropoietin (Eprex), 1.1 mM 1-thioglycerol (Sigma M6145), and 0.5% conditioned medium from a kit ligand-producing CHO cell line.

To knockdown expression of *Ikaros* (*Ikzf1*), pLKO.1 vector containing short hairpin RNA (shRNA) specific to *Ikaros* mRNA or a nonspecific scrambled shRNA (shScr) (Sigma) were transfected by viral infection into G1E-ER4 cells. Puromycin (0.3 µg/ml) was then added to the medium to select for cells with stable integration of pLKO.1 vector into cells.

OP9-DL1 cells are murine bone marrow stromal OP9 cells engineered to express constitutively the NOTCH ligand DELTA-like 1 (DLL1). These cells were used in a co-culture system to induce NOTCH activation in e14.5 mouse fetal liver EryC. At least 4 days prior to the co-culture (d-4), OP9 and OP9-DL1 cells were prepared in α -Minimum Essential Medium (α -MEM; In Vitrogen) in order to be confluent at 80% the day of co-culture (d0). At d0, OP9 and OP9-DL1 medium was removed and subsequently, cells were co-cultured for 48h (d2) with Ik^{WT} or Ik^{Null} fetal liver cells in α -MEM containing 2 U/ml erythropoietin (Eprex).

siRNA and nucleofection

Knockdown experiments with small interfering RNA (siRNA) were done in G1E-ER4 cells. The negative control siRNA (siCTL) and *Trp53* siRNA (siP53) were purchased from Dharmacon, using the siGENOME SMARTpool siRNA quality. For each nucleofection, 3×10^6 G1E-ER4 cells were collected, washed in PBS 1X and resuspended in 100 μ l of Mirus electroporation solution (Cederlane). Next, 25 μ l of 20 μ M *Trp53* siRNA (siP53) or 20 μ M negative control siRNA (siCTL) was added to the cell suspensions, which were immediately nucleofected with program G-016 (Amaxa Nucleofector II, Biosystems) according to the literature (Pope and Bresnick 2013). Before nucleofection experiments with siP53 or siCTL, program G-016 was controlled with GFP expressing vector nucleofected into cells.

Cell irradiation

Fetal liver or G1E-ER4 cells were irradiated with 3.5Gy, using a GAMA cell irradiator. Experiments were performed 3 hours post-irradiation (proteins and cDNA) in a 37°C-5% CO₂ incubator.

Protein Analysis

For protein analysis, Western blotting was done with two or three million cells per condition. Cells were lysed in SDS sample loading buffer solution (1 mM PMSF, 150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 6.8, 10% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1% bromophenol blue, 2.5% β -mercaptoethanol), then sonicated, boiled for 10 min, migrated on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). IKAROS (Cell signaling #D6N9Y), P21^{WAF1/CIP1} (BD Biosciences #556431), TP53 (Santa Cruz #393031) and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody (Jackson) were used for immunoblotting. Gapdh (Millipore) or Actin (NeoMarkers) antibody was used as loading control. Membranes were revealed with Clarity Western ECL (enhanced chemiluminescence Substrate (Bio-Rad)) with a Fujifilm LAS-4000 luminescent image analyzer.

RNA-sequencing and analysis

EryC were obtained from Ik^{WT} or Ik^{Null} mouse fetal livers at the embryonic stage e14.5. These cells were co-cultured for 48 hours on OP9 or OP9-DL1 stromal cells. mRNA profiles were generated by NGS, in biological triplicate, using Illumina cBot 2 System. The quality of the raw reads was assessed with FASTQC. Report shows no pool imbalance. After examining the quality of the raw reads, no trimming was deemed necessary. The reads were aligned to the GRCh38/mm10 genome with TopHat. The raw alignment counts were calculated with htseq-count. DESeq2 calculates the differential expression of genes directly from the raw alignment counts calculated with htseq-count. The output from DESeq2 includes the raw counts normalized relative to the total number of reads. The log₂ fold change is an estimate of the

fold change between the conditions, based on the distribution of the reads. RT-qPCR validation was performed using specific primer sets in real-time PCR with SYBR Green.

Reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

One to three million cells were washed in phosphate buffered saline (PBS) 1X and total RNA was isolated with TRIzol reagent (Ambion-Life Technologies). cDNA was generated using the All-in-One cDNA Synthesis SuperMix according to the manufacturer's instructions (Bimake). Quantitative PCR reactions were prepared with SYBR Green qPCR Master Mix (Biotool) and appropriated primers (Table S1). cDNA/ SYBR/ primers mix was run on an Applied Biosystems machine (Thermo-Fisher). Relative transcript levels were calculated using *Hprt* as a housekeeping gene. To compare gene expression levels between each condition, results were presented as the ratio of the expression of each gene to *Hprt* expression. When needed, results were expressed as a fold change compared with the control. The quantitative analysis was performed according to Pfaffl's method (Pfaffl 2001).

ChIP-qPCR assay

EryC were washed and fixed in PBS 1X + 1.5 mM EGS for 30 minutes with agitation, protected from light. Cells were complementary cross-linked for 5 minutes with 1% formaldehyde and fixation was stopped with glycine (20 mM final) for 10 minutes. Cells were spun-down and resuspended in SDS lysis buffer pH 7.6 for 10 minutes prior to sonication (Branson-Digital Sonifier) to obtain 300 to 500 bp DNA fragments. Sonicated fragments were centrifuged, diluted in dilution buffer (0.01% SDS; 1.1% Triton; 1.2 mM EDTA; 16.7 mM Tris HCl pH 8; 168.5 mM NaCl) and pre-cleared with 40 µl protein A sepharose 50% beads. Cells were then diluted 10 times with the dilution buffer and incubated overnight with the

appropriate antibody: anti-H3K4me3 (Abcam#8580), anti-H3K27me3 (Milipore#17-622), anti-H3K36me3 (Milipore#17100-32), anti-H3K79me2 (Cell Signaling#5427), anti-IKAROS (Santa-Cruz#13039), anti-NOTCH/NICD (abcam#8925) or isotype-matched immunoglobulins. Protein-DNA complexes were incubated 1 hour with 50 μ l protein A sepharose 50% beads and washed with low salt buffer (0.1% SDS; 1% Triton; 2 mM EDTA; 20 mM Tris HCl pH 8; 150 mM NaCl), high salt buffer (0.1% SDS; 1% Triton; 2 mM EDTA; 20 mM Tris HCl pH 8; 500 mM NaCl), LICL buffer (0.25 M LiCl; 1% NP40; 1% deoxycolic acid; 1 mM EDTA; 10 mM Tris HCl pH8) and TE buffer (1 mM EDTA; 10 mM Tris HCl pH8) twice. Beads were eluted and cross-linked, reverted. Genomic DNA was then purified to proceed with qPCR, using *Thp1* gene as the internal control and appropriated primers (Table S2).

Ter119/CD71 fetal liver cell sorting

Ik^{WT} or Ik^{Null} e14.5 fetal livers were washed and resuspended in PBS-5% heat-inactivated FBS. Cells were incubated for 30 minutes on ice with rat anti-Ter119, anti-rat Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-conjugated (BD-Pharmingen) and Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD71 (BioLegends) and then, sorted by high-speed fluorescence-activated cell sorting (FACS Vantage; Becton, Dickinson).

RESULTS AND DISCUSSION

A genome wide analysis was performed to identify NOTCH target genes affected by ablation of the tumor suppressor IKAROS in fetal liver Ter119+ EryC. Embryonic day 14.5 (e14.5) fetal livers were harvested from IKAROS wild type (Ik^{WT}) or knockout (Ik^{Null}) embryos. At that developmental stage, roughly 85% of the cells composing the fetal liver are EryC (Zhao,

Mei et al. 2014, Tan, Kulkeaw et al. 2017). To define the effect of IKAROS knockout when the NOTCH pathway is activated, Ik^{WT} or Ik^{Null} fetal liver cells (FL) were co-cultured with either OP9 or OP9-DL1 stromal cells (Schmitt and Zuniga-Pflucker 2002, de Pooter, Schmitt et al. 2006, Kutlesa, Zayas et al. 2009). The OP9-DL1 cells express the NOTCH ligand DELTA-like 1 (DLL1; Figure S1), conferring the external signal required for NOTCH pathway activation. After 48 hours of co-culture, cells were sorted according to their CD71 and Ter119 profiles. More than 60 % of the non-adherent cells expressed Ter119, a specific marker of mouse EryC (Figure S2; P3 and P4). No significant variation in the percentage of Ter119^{High} cells was detected between Ik^{WT} and Ik^{Null} fetal liver EryC regardless of the OP9 or OP9-DL1 co-culture model (Figure S2).

IKAROS is required for the physiological activation of NOTCH target genes upon pathway activation

RNA-sequencing (RNA-Seq) analysis was performed on the Ter119⁺ cells, in biological triplicates. Although IKAROS has been described as a repressor of NOTCH target genes, the analysis indicated that abrogation of IKAROS function does not always result in activation of NOTCH target genes. Indeed, we demonstrate two opposing patterns of gene regulation upon activation of the NOTCH pathway in an Ik^{Null} background, i.e., although IKAROS represses a group of NOTCH target genes upon NOTCH activation as expected, it also favors the stimulation of others (Figure 1A and 1B, respectively).

Comparative analysis of RNA-Seq results obtained when Ik^{Null} and Ik^{WT} Ter119⁺ cells were co-cultured with either OP9 or OP9-DL1 cells revealed 2992 genes with increased expression in Ik^{Null} EryC (Figure 1C), i.e. exhibiting a log2 fold change ≥ 0.8 and a False Discovery rate

(FDR) < 0.05. As expected, the expression of multiple NOTCH target genes was increased upon OP9-DL1 mediated activation in Ik^{WT} Ter119⁺ cells (Table S3). Differentially expressed genes were analyzed with the bioinformatic clustering software DAVID and regrouped according to cellular function (Table S4). Analysis of the transcriptome in Ik^{Null}-OP9 vs. Ik^{WT}-OP9 indicated that 2236 genes were overexpressed in Ik^{Null} Ter119⁺ cells ($\chi+\beta$; Figure 1C), whereas analysis of Ik^{Null}-OP9-DL1 vs. Ik^{WT}-OP9-DL1 revealed that 2546 genes were overexpressed in Ik^{Null} Ter119⁺ cells ($\chi+\alpha$; Figure 1C). The majority of overexpressed genes was common to both comparative analyses (1790 genes: χ set of genes; Figure 1C), suggesting that the expression of these genes was enhanced by the absence of IKAROS independently of extracellular NOTCH signaling. Consequently, the analysis of genes affected according to physiological processes suggests that Ik^{Null} mutation has a dominant effect on the EryC transcriptome in the absence as well as in the presence of NOTCH pathway activation (Ter119⁺ EryC co-cultured on OP9 or OP9-DL1) (Figure 1D). This also suggests that globally, the absence of IKAROS could affect the formation and identity of EryC since genes encoding factors important to cellular differentiation and immune system processes are affected in Ik^{null} EryC (Figure 1D). The comparative analysis of gene expressed only in Ik^{Null}-OP9 vs in Ik^{WT}-OP9 indicated that 446 genes (β set of genes) were specifically overexpressed in Ik^{Null}-OP9 (vs. Ik^{WT}-OP9), but not when co-cultured with OP9-DL1 cells (Figure 1C; Table S5); and 756 genes were uniquely overexpressed in Ik^{Null}-OP9-DL1 vs. Ik^{WT}-OP9-DL1 cells (α set of genes) (Figure 1C, Table S6). Many of the 446 genes specifically overexpressed in Ik^{Null}-OP9 cells could be functionally grouped in cell proliferation, metabolism, cell-to-cell communication and regulation of gene transcription (Table S5). Alternatively, multiple genes overexpressed in Ik^{null}-OP9-DL1 cells are grouped as positive regulators of gene transcription,

inflammation and lymphoid cell activation, or as important regulators of differentiation and proliferation of myeloid and lymphoid cells (Table S6). Thus, the additive effect of IKAROS depletion and external NOTCH signaling further disrupts the transcriptome and, most likely, the identity of EryC.

The role of IKAROS as a repressor of NOTCH target genes has been well described (Chari and Winandy 2008, Kathrein, Chari et al. 2008, Kleinmann, Geimer Le Lay et al. 2008, Ross, Mavoungou et al. 2012, Geimer Le Lay, Oravecz et al. 2014). Our RNA-Seq analysis highlighted this repressive effect of IKAROS, the significant overexpression of 223 genes (additive effect; Figure 1A) was detected in Ik^{Null} EryC co-cultured on OP9-DL1 upon NOTCH pathway activation (Ik^{null}-OP9-DL1 compared to Ik^{WT}-OP9-DL1 with a log2 fold change ≥ 0.8 and a FDR < 0.05 ; Figure 1A). Variation in the expression levels of some of these 223 genes (randomly selected) was confirmed by RT-qPCR (Figure S3). Thus, IKAROS expression is required to repress these genes, and IKAROS deletion coupled to NOTCH pathway activation can synergize to overexpress many genes in EryC (provides an additive effect; Figure 1A). The biological processes potentially affected by this additive effect are mostly associated with apoptosis, niche interaction, innate and acquired immunity, development, cellular growth and proliferation (Figure 2A). Importantly, certain genes characterized by the additive effect encode tumor suppressors or oncogenes (Table S7), abnormal expression of which should perturb hematopoietic cell homeostasis, modify cell interactions with the niche, and/or affect cellular capacity to provide an adaptive immune response.

The RNA-seq analysis also suggests that NOTCH pathway activation in an Ik^{Null} background can engender another pattern of regulation, whereby the absence of IKAROS transcriptionally desensitizes NOTCH targets to NOTCH pathway activation (Figure 1B). Indeed, our data indicated that 115 genes activated by NOTCH signaling (Ik^{WT}-OP9-DL1 vs Ik^{WT}-OP9; Log2 \geq 0.8, FDR < 0.05) were not significantly activated by NOTCH in the Ik^{Null} cells (Ik^{Null}-OP9-DL1 vs Ik^{WT}-OP9-DL1). The clustering (DAVID functional annotation analysis) of these genes suggests that the absence of IKAROS could affect cell proliferation and adhesion, and also possibly influence other signaling pathways like Wnt (Figure 2B). Oncogenes and tumor suppressor genes are among the 115 genes requiring IKAROS to be properly stimulated upon NOTCH activation (Table S8). In summary, IKAROS could be required to prime and favor the physiological activation of multiple NOTCH target genes upon NOTCH pathway activation.

Characterization of genes requiring IKAROS to attain a physiological response to the NOTCH pathway activation

To elucidate the mechanism(s) used by IKAROS to either repress or potentially prime NOTCH target genes for their activation upon signaling, we characterized the regulation of representative genes from either ‘group’. Among genes repressed by IKAROS and significantly overexpressed upon NOTCH pathway activation when IKAROS is absent in EryC, are the *Cdkn1a* and *Trp53* genes (respectively encoding P21^{WAF1/CIP1} and TP53). TP53 and its downstream effector P21^{WAF1/CIP1} are critical factors in cancer biology, and appear among the 223 genes with an additive expression effect (Figure 1A; Table S9). We found that the expression levels of *Cdkn1a* and *Trp53* were significantly increased when IKAROS

expression is abrogated in fetal liver EryC (Figure 3A). P21^{WAF1/CIP1} protein expression also increases in Ik^{Null} EryC; however this is not the case for TP53 (Figure 3B) for which expression is highly regulated by post-translational modifications (MacLaine and Hupp 2009, Brooks and Gu 2011).

To determine whether IKAROS might directly participate in regulation of *Cdkn1a* and *Trp53*, chromatin immunoprecipitations (ChIP) were performed in fetal liver EryC (e14.5). The recruitment of IKAROS was detected to the Transcription Start Site (TSS) and the Open Reading Frame (ORF) of both genes (Figure 3C, 3D; respectively). Importantly, IKAROS was undetectable at these genes in the Ik^{Null} EryC. We also assessed the NICD recruitment to the same regions and the results suggest that IKAROS and NICD can both be recruited to the TSS and ORF of these genes in fetal liver EryC (Figure 3C and 3D). Furthermore, NICD recruitment to *Cdkn1a* and *Trp53* ORF seems influenced by IKAROS and is decreased in Ik^{Null} EryC. Thus, IKAROS and NICD could be co-recruited to these NOTCH target genes. Whether IKAROS could influence the NICD recruitment to *Cdkn1a* and *Trp53*, remains to be determined. Nonetheless, our results are reminiscent of observations in thymocytes where IKAROS, NICD, and RBP-J κ (transcription factor partner of NICD) can be recruited to the same NOTCH target genes (Geimer Le Lay, Oravecz et al. 2014).

To further analyze the additive effect of IKAROS abrogation and NOTCH pathway activation, we used the OP9/OP9-DL1 co-culture system. RT-qPCR analysis indicated that, like the situation revealed by RNA-seq, the expression levels of *Cdkn1a* and *Trp53* genes were significantly increased upon NOTCH pathway activation in Ik^{Null} EryC (Figure 4A). P21^{WAF1/CIP1} protein expression was also enhanced, but this was not the case for TP53 (Figure

4B). Thus, the interplay between IKAROS and the NOTCH pathway is potentially biologically relevant, and particularly important to control the expression of P21^{WAF1/CIP1}, which is a critical regulator of stress in cells (Gorospe, Wang et al. 1999, Karimian, Ahmadi et al. 2016).

Since IKAROS was previously demonstrated to influence transcriptional activation and elongation (Ng, Yoshida et al. 2009, Schwickert, Tagoh et al. 2014, Bottardi, Mavoungou et al. 2015), we employed Chromatin ImmunoPrecipitation (ChIP) to analyze the enrichment of markers related to these aspects of transcriptional regulation. Enrichment of the histone post-translational modifications H3K27me3 H3K4me3 and H3K79me2 was assessed along *Cdkn1a* and *Trp53*. These particular histone modifications were selected since: (i) IKAROS acts with the Polycomb repressive complex 2 (PRC2; which deposits H3K27me3) to produce transcriptionally repressive chromatin at specific genes (Ross, Mavoungou et al. 2012, Oravecz, Apostolov et al. 2015); and (ii) IKAROS can interact with the positive transcription elongation factor b (P-TEFb) (Bottardi, Zmiri et al. 2011), which is required for productive transcriptional elongation of most genes (Zhou, Li et al. 2012), and both H3K4me3 and H3K79me2 are markers of productive transcriptional elongation (Gates, Foulds et al. 2017). In Ik^{WT} EryC (co-cultured on OP9 or OP9-DL1 cells), the TSS and ORF of both *Cdkn1a* and *Trp53* are characterized by H3K4me3 and H3K79me2, but significant levels of H3K27me3 are detected only at *Cdkn1a* (Figure 5A-D). In fact, in Ik^{WT} EryC, the chromatin of *Cdkn1a* resembles bivalent chromatin as reported in stem/progenitor cells, which is characterized by dual detection of H3K4me3 and H3K27me3 (Bernstein, Mikkelsen et al. 2006). Bivalent chromatin can mark genes poised for rapid transcriptional activation (Voigt, Tee et al. 2013). The expression levels and variations of H3K4me3 and H3K27me3 detected at *Cdkn1a* in Ik^{Null}

EryC (co-cultured on OP9 or OP9-DL1 cells) suggest that IKAROS could be required for the poised state of this gene. This is also supported by H3K79me2 enrichment since, overall, this follows the expression levels of *Cdkn1a* and *Trp53* that is maximal upon the additive effect imposed by Ik^{Null} and NOTCH pathway activation (Ik^{Null}-OP9-DL1). The absence of H3K27me3 along *Trp53* suggests that PRC2 is not involved in the transcription regulation imposed by IKAROS. Importantly, although IKAROS is recruited to *Trp53* (Figure 3D), the absence of IKAROS only affects *Trp53* expression when the NOTCH pathway is activated. Thus, under such conditions IKAROS might represent an alternative transcriptional mechanism, in addition to the well characterized post-translational mechanism, for maintaining low basal levels of *Trp53*.

In mammalian cells, H3K79 methylation is catalyzed by the histone methyltransferase DOT1L (Gates, Foulds et al. 2017). DOT1L is associated with productive transcriptional elongation (Veloso, Kirkconnell et al. 2014), and the observed H3K79 methylation enrichment correlates with overexpression induced by the additive effect of Ik^{Null} and NOTCH pathway activation. To further investigate the importance of DOT1L, we treated the EryC with an inhibitor of this enzyme (EPZ004777; Calbiochem#1338466-77-5). As presented in Supplementary Figure S4A and S4B, the addition of 3 μ M of the inhibitor severely impaired H3K79me2 cellular accumulation in EryC, and decreased H3K79me2 along *Cdkn1a* and *Trp53* (Supplementary Figure S4C). Interestingly, inhibition of DOT1L disrupted the additive effect imposed by Ik^{Null} and NOTCH pathway activation on *Trp53* expression (Supplementary Figure S4D). However, inhibition of DOT1L only moderately alleviated the additive effect imposed to *Cdkn1a*. This result and the DOT1L inhibitor-dependent increased expression of *Cdkn1a* and *Trp53* in Ik^{WT} EryC, could be related to the TP53-P21^{WAF1/CIP1} pathway activation

caused by genomic instability subsequent to DOT1L inhibition (Barry, Corry et al. 2010). Indeed, to provide an adapted response to genomic instability, TP53 is likely to bypass the regulation imposed by IKAROS and increase the expression level of *Cdkn1a* (P21^{WAF1/CIP1}).

Taken together, our results suggest, as previously reported in other hematopoietic lineages (Chari and Winandy 2008, Kathrein, Chari et al. 2008, Malinge, Thiollier et al. 2013, Geimer Le Lay, Oravecz et al. 2014), IKAROS can favor transcriptional repression of NOTCH target genes in erythroid cells. The H3K27me3 decrease observed at the *Cdkn1a* gene in Ik^{Null} (vs Ik^{WT}) EryC, suggests that PRC2 recruitment to this gene requires IKAROS, and that IKAROS-PRC2 are critical for *Cdkn1a* transcriptional repression and/or a poised state to facilitate rapid induction (Voigt, Tee et al. 2013). Based on our RNA-seq results, the IKAROS and PRC2 activity observed at *Cdkn1a* gene are likely also operational at other NOTCH target genes in EryC (Table S9). Furthermore, such a link between IKAROS and PRC2 in gene repression has been previously reported in thymocytes (Oravecz, Apostolov et al. 2015). However, negative regulation of *Trp53* by IKAROS does not seem to require PRC2, suggesting involvement of another regulatory mechanism. Interestingly, the additive effect of Ik^{Null} and NOTCH pathway activation correlates with a significant increase of H3K79 methylation at both *Cdkn1a* and *Trp53*; moreover we show that this additive effect is impaired when cells are treated with an inhibitor of DOT1L. Thus, the additive effect is likely to be related to disruption of the poised transcriptional state of NOTCH target genes, and to modifications in their transcription elongation, where DOT1L activity appears to be required.

Disruption of the IKAROS-dependent recruitment of NuRD complex leads to the abnormal expression of NOTCH target genes

The possible implication of chromatin remodeling activities in the additive effect of Ik^{Null} and activation of NOTCH pathway was also explored. In association with the remodeling complex NuRD, IKAROS can influence the chromatin organization of gene regulatory regions, transcription initiation and transcription elongation (Bottardi, Mavoungou et al. 2014, Bottardi, Mavoungou et al. 2015, Georgopoulos 2017). Additionally, in EryC, IKAROS was shown to interact with the PYR complex, which includes subunits of the NuRD and BAF complexes (O'Neill, Schoetz et al. 2000). Interestingly, NICD was also reported to interact with NuRD and PBAF subunits (Yatim, Benne et al. 2012). Thus, we assessed the recruitment of NuRD and P/BAF (BAF or PBAF) to *Cdkn1a* and *Trp53* in EryC.

As expected, the NuRD ATP-dependent remodeling enzyme CHD4 was recruited to *Cdkn1a* and *Trp53* (TSS and ORF regions) in the Ik^{WT} EryC co-cultured with OP9 or OP9-DL1 cells (Figure 6A, 6B). Recruitment of CHD4 to these genes was significantly impaired in the Ik^{Null} EryC co-cultured with OP9 or OP9-DL1 cells. Nonetheless, CHD4/NuRD recruitment is increased in EryC of Ik^{WT} -OP9-DL1 vs the EryC of Ik^{WT} -OP9 (Figure 6A, 6B), suggesting that such recruitment is favored by the signaling-dependent enhancement of NICD binding to these genes. BRG1 is recruited to *Cdkn1a* and *Trp53* in Ik^{Null} EryC, particularly when the NOTCH pathway is activated (Ik^{Null} -OP9-DL1; Figure 6A and 6B). Thus, BRG1 (P/BAF) recruitment to *Cdkn1a* and *Trp53* is significant when IKAROS-CHD4/NuRD are absent and NICD recruitment is enhanced, which is attained by the additive effect of Ik^{Null} and the NOTCH pathway activation.

We then assessed whether genes requiring IKAROS to be primed for activation upon NOTCH signaling (not responsive to NOTCH activation in Ik^{Null} Ter119+ EryC; Figure 1B)

were also characterized by IKAROS-dependent duality for the CHD4/NuRD and BRG1/BAF recruitment. Two NOTCH target genes non-responsive to signaling when IKAROS is absent were selected for the analysis, i.e. *Prdm16* and *Nrarp* (Figure 7A). PRDM16 is an important factor involved in the homeostasis of early hematopoietic cells as stem cells and progenitors (Aguilo, Avagyan et al. 2011). It has been well described as a fusion partner in AML (Nishikata, Sasaki et al. 2003, Sakai, Tamura et al. 2005) but its oncogenic behavior seems to be highly dependent of its N-terminal PR-domain (Corrigan, Luchsinger et al. 2018). NRARP is described as a negative feedback regulator of the NOTCH pathway (Krebs, Deftos et al. 2001). It is also an oncogene, found overexpressed in some cancers including breast, liver, thyroid and non-small cell lung cancers (Imaoka, Okutani et al. 2014, Zhu, Wang et al. 2015, Chu, Qin et al. 2016, Liao, Chen et al. 2018). Moreover, T-ALL and CLL cell lines show an overexpression of *Nrarp* due to NOTCH activation (Durinck, Wallaert et al. 2014, Fabbri, Holmes et al. 2017). We found that IKAROS expression and the chromatin recruitment of CHD4/NuRD are required for stimulation of these genes upon NOTCH pathway activation (Ik^{WT}-OP9-DL1 vs Ik^{Null}-OP9-DL1; Figure 7B). Recruitment of BRG1 to *Prdm16* and *Nrarp* is related to NOTCH pathway activation, but this does not correlate with their transcriptional activation or repression (Figure 7C). The results suggest that both CHD4/NuRD and BRG1/BAF are needed for enhanced expression of these genes upon NOTCH pathway activation. Furthermore, recruitment of IKAROS-NuRD to *Prdm16* and *Nrarp* when the Ik^{WT} EryC are co-cultured on OP9 cells (absence of NOTCH pathway activation) and the genes are not active, led us to posit that IKAROS-NuRD is required to prime these genes for activation by promoting the formation of a poised chromatin state. To test this possibility, we assessed the presence of H3K4me3 and H3K27me3 at *Prdm16* and *Nrarp*. As we suspected, in the

presence of IKAROS-NuRD, the TSS region of *Prdm16* and *Nrarp* was characterized by significant enrichment of these chromatin marks (Supplementary Figure S5), which in turn indicates bivalent chromatin of genes poised for rapid transcriptional activation (Voigt, Tee et al. 2013). Importantly, in the absence of IKAROS (Ik^{Null} EryC), the enrichment of H3K4me3 and H3K79me3 is significantly decreased at *Prdm16* and *Nrarp*, thus suggesting that IKAROS recruitment to these genes influences their chromatin organization and, most likely, their transcriptional elongation.

IKAROS effect on genotoxic stress response and the cellular response to NOTCH signaling

We then questioned the biological relevance of increased $\text{P21}^{\text{WAF1/CIP1}}$ expression in Ik^{Null} EryC, and in Ik^{Null} EryC co-cultured on OP9-DL1 (NOTCH pathway activation). Since the expression levels of TP53 and $\text{P21}^{\text{WAF1/CIP1}}$ are both influenced by DNA damage, we tested whether the absence of IKAROS and/or the NOTCH pathway activation could influence the activation of TP53 leading to increased level of $\text{P21}^{\text{WAF1/CIP1}}$ upon exposure to ionizing radiation (IR;3.5 Gy). As in non-irradiated EryC, we found that the expression level of $\text{P21}^{\text{WAF1/CIP1}}$ was increased in irradiated Ik^{Null} EryC (Ik^{Null} -OP9 vs Ik^{WT} -OP9; Figure 8A). Importantly, $\text{P21}^{\text{WAF1/CIP1}}$ levels were further enhanced in the Ik^{Null} EryC co-cultured with the OP9-DL1 cells (vs the Ik^{WT} -OP9-DL1). Thus, upon DNA damage induction in EryC, $\text{P21}^{\text{WAF1/CIP1}}$ expression is enhanced by the absence of IKAROS in the presence of NOTCH pathway activation. Like in non-irradiated EryC, $\text{P21}^{\text{WAF1/CIP1}}$ is overexpressed upon the additive effect of Ik^{Null} and NOTCH pathway activation. To address the importance of TP53 in the increased expression of $\text{P21}^{\text{WAF1/CIP1}}$, we used the erythroid model cell line G1E-ER4

(GATA-1 null cell line expressing an inducible GATA-1-estrogen receptor fusion protein: GATA-1-ER protein (Simon, Pevny et al. 1992, Weiss, Yu et al. 1997, Rylski, Welch et al. 2003)) induced with Tamoxifen, which allows the nuclear accumulation of the transcription factor GATA-1 and thereby, the differentiation of these cells into erythroid cells (Weiss, Yu et al. 1997). *Trp53* alone or *Trp53* with *Ikaros* were knocked down in these cells. As demonstrated in Figure 8B and 8C, the knockdown of IKAROS also results in the increased expression of P21^{WAF1/CIP1} in these cells, and the IKAROS effect is enhanced when the cells are irradiated. The results in G1E-ER4 cells also demonstrate that TP53 expression is required for optimal enhancement of P21^{WAF1/CIP1} after irradiation. Nonetheless, in the absence of TP53 the *Ikaros* knockdown also favors the increased expression of P21^{WAF1/CIP1} (with or without IR exposure). These results suggest that IKAROS can influence the expression level of P21^{WAF1/CIP1} (*Cdkn1a*) independently of TP53.

Taken together, our results indicate that, similar to the situation in lymphoid cells (Geimer Le Lay, Oravecz et al. 2014), IKAROS is required for repression of many NOTCH target genes in EryC. However, we also demonstrate that to other NOTCH target gene, IKAROS expression is required to prime their NOTCH-dependent expression. IKAROS facilitates the recruitment of the NuRD complex and the organization of a chromatin state typical of transcriptionally poised genes. Investigation of the influence of IKAROS on the NOTCH targets *Trp53* and *Cdkn1a* suggests that the former is a critical determinant of a novel regulatory pathway controlling P21^{WAF1/CIP1} expression level independently of TP53. Finally, the effect of IKAROS on P21^{WAF1/CIP1} expression was detected under normal culture conditions and upon stress induction imposed either by the activation of the NOTCH pathway or the genotoxic exposure of hematopoietic cells. The disruption of P21^{WAF1/CIP1} regulation in

the absence of IKAROS should facilitate cell cycle arrest and potentially apoptosis or senescence (Macleod, Sherry et al. 1995, Enge, Bao et al. 2009, Papetti, Wontakal et al. 2010, Shtutman, Chang et al. 2017, Huang, Hale et al. 2018). Whether it could favors hematological malignancies like myelodysplastic syndrome or leukemia, is unknown. However, the controlled expression of P21^{WAF1/CIP1} is important to control erythroid cell formation and homeostasis (Goardon, Lambert et al. 2006, Papetti, Wontakal et al. 2010).

Altogether, the results presented here suggest that the effect of IKAROS mutation or expression of IKAROS dominant negative isoforms such as those characterizing different forms of leukemias (Dijon, Bardin et al. 2008, Iacobucci, Lonetti et al. 2008, Wang, Howarth et al. 2014, Reyes-Leon, Juarez-Velazquez et al. 2015), can be exacerbated by stress induction imposed by NOTCH signaling or by genotoxic agents.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. RNA-sequencing analysis of Ter119+ EryC Ik^{Null} and Ik^{WT} upon NOTCH pathway activation. (A, B) Two expression patterns obtained from the RNA-sequencing : (A) 223 genes respond to IKAROS mutation and NOTCH pathway activation by an additive effect (overexpression); (B) 20 Ikaros-targeted genes normally activated by NOTCH in Ik^{WT} ($\log_2 \geq 0.8$ and a p value < 0.05) but no more responding to NOTCH pathway activation in Ik^{Null} Ter119+ cells ($\log_2 < 0.8$). (C) Venn Diagram representing the overexpressed genes ($\log_2 \geq 0.8$) in Ik^{Null} vs Ik^{WT} Ter119+ cells on OP9-DL1 cells (left circle) or overexpressed ($\log_2 \geq 0.8$) in Ik^{Null} vs Ik^{WT} cells on OP9 cells (right circle). (D) Comparative RNA expression of Ter119+ Ik^{Null} vs Ik^{WT} cultured either on OP9 (upper panel) or OP9-DL1 (lower panel). The bar graphs are presenting the number of genes overexpressed in Ik^{Null} with a $\log_2 \geq 0.8$ a FDR < 0.05 and a p value < 0.05 . The RNA-sequencing results were used and analyzed with DAVID (Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis) software to classify genes according to biological function.

Figure 2. IKAROS mutation promotes the deregulation of several functional groups of genes upon NOTCH activation. (A, B) Comparative mRNA expression of (A) the 223 genes characterized by their overexpression (additive effect) and (B) the 115 genes no more responsive to NOTCH pathway activation in Ik^{Null} Ter119+ cells. The bar graphs are presenting the number of genes associated with the functional annotation indicated on the x-axis. RNA-sequencing results were used and analyzed with DAVID (Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis) software to classify genes according to biological function.

Figure 3. Characterization of *Cdkn1a* and *Trp53* genes in Ik^{Null} and Ik^{WT} mouse fetal liver EryC. (A) Relative expression of *Cdkn1a* and *Trp53* genes measured by RT-qPCR. The relative expression was calculated according to the control condition Ik^{WT} and using *Hprt* as the internal control (*: $p \leq 0.05$ by Student's t test; $n \geq 3$). (B) Western blot analysis of IKAROS, P21^{WAF1/CIP1}, TP53 and GAPDH (Control). (C, D) The bar graphs are presenting the relative recruitment of IKAROS or NOTCH/NICD to the *Cdkn1a* gene (TSS, ORF +3kb; C) and *Trp53* gene (TSS, ORF +5kb; D) expressed as fold enrichment with standard deviations. The ChIP assay was performed with anti-IKAROS, anti-NOTCH/NICD or isotype-matched immunoglobulin G (rabbit) and analyzed by qPCR. The fold enrichment was calculated using *THP1* promoter region as the internal control; a value of 1 indicates no enrichment. *: $p \leq 0.05$ by Student's t test; $n=3$.

Figure 4. *Cdkn1a* and *Trp53* gene and protein expression in Ik^{Null} and Ik^{WT} mouse fetal liver EryC upon activation of the NOTCH pathway. (A) Relative expression of *Cdkn1a* and *Trp53* genes measured by RT-qPCR when the NOTCH pathway is not induced (OP9 condition). The relative expression was calculated according to the control condition OP9 Ik^{WT} and using *Hprt* as the internal control (*: $p \leq 0.05$ by Student's t test; $n=5$). (B) Western blot analysis of IKAROS, P21^{WAF1/CIP1}, TP53 and ACTIN (control) with P21^{WAF1/CIP1} or TP53 relative protein level calculated when compared to ACTIN (blue line).

Figure 5. Enrichment of histone post-translational modifications related to transcription activation and elongation at *Cdkn1a* and *Trp53* genes in Ik^{Null} and Ik^{WT} mouse fetal liver EryC co-cultured with OP9 or OP9-DL1 cells. Bar graphs are presenting the relative recruitment of H3K4me3, H3K79me2 or H3K27me3 to the *Cdkn1a* gene (TSS, ORF +3kb)

and *Trp53* gene (TSS, ORF +5kb) expressed as fold enrichment with standard deviations. The ChIP assay was performed with anti-H3K4me3, anti-H3K79me2, anti-H3K27me3 or isotype-matched immunoglobulin G (rabbit) and analyzed by qPCR. The fold enrichment was calculated using *THP1* as the internal control; a value of 1 indicates no enrichment . *: $p \leq 0.05$ by Student's t test; n=3.

Figure 6. BRG1 and CHD4 enrichments to *Cdkn1a* and *Trp53* genes in Ik^{Null} and Ik^{WT} mouse fetal liver EryC co-cultured on OP9 or OP9-DL1 cells. Bar graphs are presenting the relative enrichment of BRG1 and CHD4 to the *Cdkn1a*, and *Trp53* (TSS and ORF regions) genes. Y axis is indicating the fold enrichment with standard deviations. ChIPs were performed with anti-BRG1, anti-CHD4 or isotype-matched immunoglobulin G (rabbit or mouse, respectively) and analyzed by qPCR. The fold enrichment was calculated using *THP1* as the internal control; *: $p < 0.05$ by Student's t test; n=3.

Figure 7. Characterization of *Nrarp* and *Prdm16* genes in Ik^{Null} and Ik^{WT} mouse fetal liver EryC co-cultured with OP9 or OP9-DL1 cells. (A) Relative expression of *Nrarp* and *Prdm16* genes defined by RNA-sequencing analysis. (B, C): CHD4 (B) and BRG1 (C) enrichments to *Nrarp* or *Prdm16* TSS region. Bar graphs are presenting the relative recruitment of BRG1 and CHD4 to the *Nrarp*, and *Prdm16* genes expressed as fold enrichment with standard deviations. ChIPs were performed with anti-BRG1, anti-CHD4 or isotype-matched immunoglobulin G (rabbit or mouse, respectively) and analyzed by qPCR. The fold enrichment was calculated using *THP1* as the internal control; a value of 1 indicates no enrichment . *: $p < 0.05$ by Student's t test; n=3.

Figure 8. Determination of the influence of IKAROS on TP53 and P21^{WAF1/CIP1} expression when the cells are exposed to ionizing radiation. (A) Western blot analysis of IKAROS, TP53, P21^{WAF1/CIP1} and ACTIN (control) in whole-cell extracts of Ik^{WT} or Ik^{Null} fetal liver EryC harvested after 48 hours of co-culture with OP9 or OP9-DL1 cells and collected 3 hours post-irradiation (3.5Gy) or without irradiation, as control. (B, C) G1E-ER4 cells were transfected either with scr332 (control) or sh322 (shRNA IKAROS); (B) Bars are presenting IKAROS protein relative expression vs IKAROS expression in scr332 (value of 1). ACTIN was used as internal control; (C) Western blot analysis of IKAROS, P21^{WAF1/CIP1}, TP53 and ACTIN or GAPDH (controls) in whole-cell extracts of G1E-ER4 scr332 and sh322 after transfection with either siNT (control) or siP53 and collected 3h post-irradiation (3.5Gy). TP53 and GAPDH (lower panels) were obtained from a reloading of the same samples that were used for IKAROS, P21^{WAF1/CIP1} and ACTIN.

REFERENCES

- Abdallah, E. A., M. F. Fanelli, E. S. V. Souza, M. C. Machado Netto, J. L. Gasparini Junior, D. V. Araujo, L. M. Ocea, M. E. Buim, M. S. Tariki, S. Alves Vda, V. Piana de Andrade, A. L. Dettino, C. Abdon Lopes de Mello and L. T. Chinen (2016). "MRP1 expression in CTCs confers resistance to irinotecan-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer." Int J Cancer **139**(4): 890-898.
- Aguilo, F., S. Avagyan, A. Labar, A. Sevilla, D. F. Lee, P. Kumar, I. R. Lemischka, B. Y. Zhou and H. W. Snoeck (2011). "Prdm16 is a physiologic regulator of hematopoietic stem cells." Blood **117**(19): 5057-5066.
- Akitake-Kawano, R., H. Seno, M. Nakatsuji, Y. Kimura, Y. Nakanishi, T. Yoshioka, K. Kanda, M. Kawada, K. Kawada, Y. Sakai and T. Chiba (2013). "Inhibitory role of Gas6 in intestinal tumorigenesis." Carcinogenesis **34**(7): 1567-1574.
- Alderton, G. K. (2011). "T cell opposition." Nature Reviews Cancer **11**: 232.
- Amin, E. M., Y. Liu, S. Deng, K. S. Tan, N. Chudgar, M. W. Mayo, F. Sanchez-Vega, P. S. Adusumilli, N. Schultz and D. R. Jones (2017). "The RNA-editing enzyme ADAR promotes lung adenocarcinoma migration and invasion by stabilizing FAK." Science Signaling **10**(497): eaah3941.
- Antonipillai, J. and S. Francis (2018). Inhibition of LIM kinase inhibits cancer growth.
- Atashrazm, F., R. M. Lowenthal, G. M. Woods, A. F. Holloway, S. S. Karpiniec and J. L. Dickinson (2016). "Fucoidan Suppresses the Growth of Human Acute Promyelocytic Leukemia Cells In Vitro and In Vivo." J Cell Physiol **231**(3): 688-697.

- Aubrey, B. J., A. Strasser and G. L. Kelly (2016). "Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway." Cold Spring Harb Perspect Med **6**(5).
- Bais, M. V., G. B. Ozdener, G. E. Sonenshein and P. C. Trackman (2015). "Effects of tumor-suppressor lysyl oxidase propeptide on prostate cancer xenograft growth and its direct interactions with DNA repair pathways." Oncogene **34**(15): 1928-1937.
- Bandini, S., M. Macagno, A. Hysi, S. Lanzardo, L. Conti, A. Bello, F. Riccardo, R. Ruiiu, I. F. Merighi, G. Forni, M. Iezzi, E. Quaglino and F. Cavallo (2016). "The non-inflammatory role of C1q during Her2/neu-driven mammary carcinogenesis." Oncoimmunology **5**(12): e1253653-e1253653.
- Bank, A. (2006). "Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities." Blood **107**(2): 435-443.
- Barry, E. R., G. N. Corry and T. P. Rasmussen (2010). "Targeting DOT1L action and interactions in leukemia: the role of DOT1L in transformation and development." Expert Opin Ther Targets **14**(4): 405-418.
- Bellavia, D., M. Mecarozzi, A. F. Campese, P. Grazioli, A. Gulino and I. Screpanti (2007). "Notch and Ikaros: not only converging players in T cell leukemia." Cell Cycle **6**(22): 2730-2734.
- Benavente, M. A., C. P. Bianchi, F. Imperiale and M. A. Aba (2016). "Antiproliferative Effects of Oxytocin and Desmopressin on Canine Mammary Cancer Cells." Front Vet Sci **3**: 119.
- Bernstein, B. E., T. S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D. J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, R. Jaenisch, A. Wagschal, R. Feil, S. L. Schreiber and E. S.

Lander (2006). "A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells." Cell **125**(2): 315-326.

Berta, J., M. A. Hoda, V. Laszlo, A. Rozsas, T. Garay, S. Torok, M. Grusch, W. Berger, S. Paku, F. Renyi-Vamos, B. Masri, J. Tovari, M. Groger, W. Klepetko, B. Hegedus and B. Dome (2014). "Apelin promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis." Oncotarget **5**(12): 4426-4437.

Bottardi, S., L. Mavoungou, V. Bourgoïn, N. Mashtalir, E. B. Affar and E. Milot (2013). "Direct Protein Interactions Are Responsible for Ikaros-GATA and Ikaros-Cdk9 Cooperativeness in Hematopoietic Cells." **33**(16): 3064-3076.

Bottardi, S., L. Mavoungou and E. Milot (2015). "IKAROS: a multifunctional regulator of the polymerase II transcription cycle." Trends Genet **31**(9): 500-508.

Bottardi, S., L. Mavoungou, H. Pak, S. Daou, V. Bourgoïn, Y. A. Lakehal, B. Affar el and E. Milot (2014). "The IKAROS interaction with a complex including chromatin remodeling and transcription elongation activities is required for hematopoiesis." PLoS Genet **10**(12): e1004827.

Bottardi, S., J. Ross, V. Bourgoïn, N. Fotouhi-Ardakani, B. Affar el, M. Trudel and E. Milot (2009). "Ikaros and GATA-1 combinatorial effect is required for silencing of human gamma-globin genes." Mol Cell Biol **29**(6): 1526-1537.

Bottardi, S., F. A. Zmiri, V. Bourgoïn, J. Ross, L. Mavoungou and E. Milot (2011). "Ikaros interacts with P-TEFb and cooperates with GATA-1 to enhance transcription elongation." Nucleic Acids Res **39**(9): 3505-3519.

Bray, S. J. (2006). "Notch signalling: a simple pathway becomes complex." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(9): 678-689.

- Brooks, C. L. and W. Gu (2011). "p53 regulation by ubiquitin." FEBS Letters **585**(18): 2803-2809.
- Brown, K. E., S. S. Guest, S. T. Smale, K. Hahm, M. Merkenschlager and A. G. Fisher (1997). "Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin." Cell **91**(6): 845-854.
- Bu, X., J. Kato, J. A. Hong, M. J. Merino, D. S. Schrump, F. E. Lund and J. Moss (2018). "CD38 knockout suppresses tumorigenesis in mice and clonogenic growth of human lung cancer cells." Carcinogenesis **39**(2): 242-251.
- Burger, R. (2013). "Impact of interleukin-6 in hematological malignancies." Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie **40**(5): 336-343.
- Carmichael, C. L., S. Goossens, J. Wang, T. Nguyen, K. Haigh, G. Berx, B. Kile and J. J. Haigh (2016). "The EMT Modulator SNAI1 Drives AML Development Via Its Interaction with the Chromatin Modulator LSD1." Blood **128**(22): 2688.
- Casalou, C., A. Faustino and D. C. Barral (2016). "Arf proteins in cancer cell migration." Small GTPases **7**(4): 270-282.
- Caspi, M., G. Perry, N. Skalka, S. Meisel, A. Firsow, M. Amit and R. Rosin-Arbesfeld (2014). "Aldolase positively regulates of the canonical Wnt signaling pathway." Molecular cancer **13**: 164-164.
- Cassoni, P., A. Sapino, N. Fortunati, L. Munaron, B. Chini and G. Bussolati (1997). "Oxytocin inhibits the proliferation of MDA-MB231 human breast-cancer cells via cyclic adenosine monophosphate and protein kinase A." Int J Cancer **72**(2): 340-344.

- Cassoni, P., A. Sapino, M. Papotti and G. Bussolati (1996). "Oxytocin and oxytocin-analogue F314 inhibit cell proliferation and tumor growth of rat and mouse mammary carcinomas." Int J Cancer **66**(6): 817-820.
- Cathcart, J. M., A. Banach, A. Liu, J. Chen, M. Goligorsky and J. Cao (2016). "Interleukin-6 increases matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) levels via down-regulation of p53 to drive cancer progression." Oncotarget **7**(38): 61107-61120.
- Chari, S. and S. Winandy (2008). "Ikaros regulates Notch target gene expression in developing thymocytes." J Immunol **181**(9): 6265-6274.
- Che, M.-I., J. Huang, J.-S. Hung, Y.-C. Lin, M.-J. Huang, H.-S. Lai, W.-M. Hsu, J.-T. Liang and M.-C. Huang (2014). " β 1, 4-N-acetylgalactosaminyltransferase III modulates cancer stemness through EGFR signaling pathway in colon cancer cells." Oncotarget **5**(11): 3673-3684.
- Chen, G. Y., M. H. Shaw, G. Redondo and G. Núñez (2008). "The Innate Immune Receptor Nod1 Protects the Intestine from Inflammation-Induced Tumorigenesis." Cancer Research **68**(24): 10060.
- Chen, J. R., X. H. Jia, H. Wang, Y. J. Yi, J. Y. Wang and Y. J. Li (2016). "Timosaponin A-III reverses multi-drug resistance in human chronic myelogenous leukemia K562/ADM cells via downregulation of MDR1 and MRP1 expression by inhibiting PI3K/Akt signaling pathway." Int J Oncol **48**(5): 2063-2070.
- Chen, L., L. Diao, Y. Yang, X. Yi, B. L. Rodriguez, Y. Li, P. A. Villalobos, T. Cascone, X. Liu, L. Tan, P. L. Lorenzi, A. Huang, Q. Zhao, D. Peng, J. Fradette, D. H. Peng, C. Ungewiss, J. D. Roybal, P. Tong, J. Oba, F. Skoulidis, W. Peng, B. W. Carter, C. M. Gay, Y. Fan, C. A. Class, J. Zhu, J. Rodriguez-Canales, M. Kawakami, L. A. Byers, S. E. Woodman, V. A.

Papadimitrakopoulou, E. Dmitrovsky, J. Wang, S. E. Ullrich, I. I. Wistuba, J. V. Heymach, F. X.-F. Qin and D. L. Gibbons (2018). "CD38-mediated immunosuppression as a mechanism of tumor cell escape from PD-1/PD-L1 blockade." Cancer Discovery: CD-17-1033.

Chen, M. T., L. Dong, X. H. Zhang, X. L. Yin, H. M. Ning, C. Shen, R. Su, F. Li, L. Song, Y. N. Ma, F. Wang, H. L. Zhao, J. Yu and J. W. Zhang (2015). "ZFP36L1 promotes monocyte/macrophage differentiation by repressing CDK6." Sci Rep **5**: 16229.

Chen, R., M. Liu, H. Li, Y. Xue, W. N. Ramey, N. He, N. Ai, H. Luo, Y. Zhu, N. Zhou and Q. Zhou (2008). "PP2B and PP1alpha cooperatively disrupt 7SK snRNP to release P-TEFb for transcription in response to Ca²⁺ signaling." Genes Dev **22**(10): 1356-1368.

Chen, Y., Q. Zhou, L. Zhang, R. Wang, M. Jin, Y. Qiu and D. Kong (2016). "Idelalisib induces G1 arrest and apoptosis in chronic myeloid leukemia K562 cells." Oncol Rep **36**(6): 3643-3650.

Cho, H., S.-J. Lim, K. Y. Won, G. E. Bae, G. Y. Kim, J. W. Min and B.-J. Noh (2016). "Eosinophils in Colorectal Neoplasms Associated with Expression of CCL11 and CCL24." Journal of pathology and translational medicine **50**(1): 45-51.

Chu, B. F., Y. Y. Qin, S. L. Zhang, Z. W. Quan, M. D. Zhang and J. W. Bi (2016). "Downregulation of Notch-regulated Ankyrin Repeat Protein Exerts Antitumor Activities against Growth of Thyroid Cancer." Chin Med J (Engl) **129**(13): 1544-1552.

Chu, C. S., B. Xue, C. Tu, Z. H. Feng, Y. H. Shi, Y. Miao and C. J. Wen (2007). "NRAGE suppresses metastasis of melanoma and pancreatic cancer in vitro and in vivo." Cancer Lett **250**(2): 268-275.

Compagno, M., W. K. Lim, A. Grunn, S. V. Nandula, M. Brahmachary, Q. Shen, F. Bertoni, M. Ponzoni, M. Scandurra, A. Califano, G. Bhagat, A. Chadburn, R. Dalla-Favera and L.

Pasqualucci (2009). "Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma." Nature **459**(7247): 717-721.

Corno, C., L. Gatti, C. Lanzi, N. Zaffaroni, D. Colombo and P. Perego (2016). "Role of the Receptor Tyrosine Kinase Axl and its Targeting in Cancer Cells." Curr Med Chem **23**(15): 1496-1512.

Corrigan, D. J., L. L. Luchsinger, M. Justino de Almeida, L. J. Williams, A. Strikoudis and H.-W. Snoeck (2018). "PRDM16 isoforms differentially regulate normal and leukemic hematopoiesis and inflammatory gene signature." The Journal of Clinical Investigation **128**(8): 3250-3264.

Costa, V., R. Esposito, C. Ziviello, R. Sepe, L. V. Bim, N. A. Cacciola, M. Decaussin-Petrucci, P. Pallante, A. Fusco and A. Ciccodicola (2015). "New somatic mutations and WNK1-B4GALNT3 gene fusion in papillary thyroid carcinoma." Oncotarget **6**(13): 11242-11251.

Darash-Yahana, M., J. Gillespie, S. Hewitt, Y.-Y. Chen, S. Maeda, I. Stein, A. Peled, E. Pikarsky, M. Karin and J. Farber (2007). "CXCL16 and CXCR6 may promote inflammation-associated cancer growth through autocrine effects on cancer cells and paracrine effects on leukocytes." Cancer Research **67**(9 Supplement): 5122.

Daulat, A. M., F. Bertucci, S. Audebert, A. Serge, P. Finetti, E. Josselin, R. Castellano, D. Birnbaum, S. Angers and J. P. Borg (2016). "PRICKLE1 Contributes to Cancer Cell Dissemination through Its Interaction with mTORC2." Dev Cell **37**(4): 311-325.

de Boeck, M., C. Cui, A. A. Mulder, C. R. Jost, S. Ikeno and P. ten Dijke (2016). "Smad6 determines BMP-regulated invasive behaviour of breast cancer cells in a zebrafish xenograft model." Scientific Reports **6**: 24968.

de Pooter, R. F., T. M. Schmitt, J. L. de la Pompa, Y. Fujiwara, S. H. Orkin and J. C. Zuniga-Pflucker (2006). "Notch signaling requires GATA-2 to inhibit myelopoiesis from embryonic stem cells and primary hemopoietic progenitors." J Immunol **176**(9): 5267-5275.

Deep, G., A. K. Jain, A. Ramteke, H. Ting, K. C. Vijendra, S. C. Gangar, C. Agarwal and R. Agarwal (2014). "SNAIL1 is critical for the aggressiveness of prostate cancer cells with low E-cadherin." Mol Cancer **13**: 37.

Deutsch, A. J., B. Rinner, K. Wenzl, M. Pichler, K. Troppan, E. Steinbauer, D. Schwarzenbacher, S. Reitter, J. Feichtinger, S. Tierling, A. Prokesch, M. Scheideler, A. Krogsdam, G. G. Thallinger, H. Schaidler, C. Beham-Schmid and P. Neumeister (2014). "NR4A1-mediated apoptosis suppresses lymphomagenesis and is associated with a favorable cancer-specific survival in patients with aggressive B-cell lymphomas." Blood **123**(15): 2367-2377.

Dhasarathy, A., D. Phadke, D. Mav, R. R. Shah and P. A. Wade (2011). "The transcription factors Snail and Slug activate the transforming growth factor-beta signaling pathway in breast cancer." PLoS One **6**(10): e26514.

Di Liddo, R., D. Bridi, M. Gottardi, S. De Angeli, C. Grandi, A. Tasso, T. Bertalot, G. Martinelli, F. Gherlinzoni and M. T. Conconi (2016). "Adrenomedullin in the growth modulation and differentiation of acute myeloid leukemia cells." Int J Oncol **48**(4): 1659-1669.

Dietrich, C. and B. Kaina (2010). "The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth." Carcinogenesis **31**(8): 1319-1328.

Dijon, M., F. Bardin, A. Murati, M. Batoz, C. Chabannon and C. Tonnelles (2008). "The role of Ikaros in human erythroid differentiation." Blood **111**(3): 1138-1146.

Drakos, E., G. Z. Rassidakis, V. Leventaki, W. Guo, L. J. Medeiros and L. Nagarajan (2007). "Differential expression of the human MIXL1 gene product in non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas." Hum Pathol **38**(3): 500-507.

Du, Q., Y. Zhang, X. X. Tian, Y. Li and W. G. Fang (2009). "MAGE-D1 inhibits proliferation, migration and invasion of human breast cancer cells." Oncol Rep **22**(3): 659-665.

Dufies, M., A. Jacquell, N. Belhacene, G. Robert, T. Cluzeau, F. Luciano, J. P. Cassuto, S. Raynaud and P. Auberger (2011). "Mechanisms of AXL overexpression and function in Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells." Oncotarget **2**(11): 874-885.

Dumortier, A., P. Kirstetter, P. Kastner and S. Chan (2003). "Ikaros regulates neutrophil differentiation." Blood **101**(6): 2219-2226.

Durinck, K., A. Wallaert, I. Van de Walle, W. Van Loocke, P.-J. Volders, S. Vanhauwaert, E. Geerdens, Y. Benoit, N. Van Roy, B. Poppe, J. Soulier, J. Cools, P. Mestdagh, J. Vandesompele, P. Rondou, P. Van Vlierberghe, T. Taghon and F. Speleman (2014). "The Notch driven long non-coding RNA repertoire in T-cell acute lymphoblastic leukemia." Haematologica **99**(12): 1808-1816.

Eirew, P., A. Steif, J. Khattra, G. Ha, D. Yap, H. Farahani, K. Gelmon, S. Chia, C. Mar, A. Wan, E. Laks, J. Biele, K. Shumansky, J. Rosner, A. McPherson, C. Nielsen, A. J. Roth, C. Lefebvre, A. Bashashati, C. de Souza, C. Siu, R. Aniba, J. Brimhall, A. Oloumi, T. Osako, A. Bruna, J. L. Sandoval, T. Algara, W. Greenwood, K. Leung, H. Cheng, H. Xue, Y. Wang, D. Lin, A. J. Mungall, R. Moore, Y. Zhao, J. Lorette, L. Nguyen, D. Huntsman, C. J. Eaves, C. Hansen, M. A. Marra, C. Caldas, S. P. Shah and S. Aparicio (2015). "Dynamics of genomic

clones in breast cancer patient xenografts at single-cell resolution." Nature **518**(7539): 422-426.

Enge, M., W. Bao, E. Hedström, S. P. Jackson, A. Moumen and G. Selivanova (2009). "MDM2-Dependent Downregulation of p21 and hnRNP K Provides a Switch between Apoptosis and Growth Arrest Induced by Pharmacologically Activated p53." Cancer Cell **15**(3): 171-183.

Escudero-Esparza, A., T. A. Martin, M. L. Davies and W. G. Jiang (2009). "PGF isoforms, PLGF-1 and PGF-2, in colorectal cancer and the prognostic significance." Cancer Genomics Proteomics **6**(4): 239-246.

Fabbri, G., A. B. Holmes, M. Viganotti, C. Scuoppo, L. Belver, D. Herranz, X.-J. Yan, Y. Kieso, D. Rossi, G. Gaidano, N. Chiorazzi, A. A. Ferrando and R. Dalla-Favera (2017). "Common nonmutational *NOTCH1* activation in chronic lymphocytic leukemia." Blood **114**(14): E2911-E2919.

Feng, M., G. Yao, H. Yu, Y. Qing and K. Wang (2016). "Tumor apelin, not serum apelin, is associated with the clinical features and prognosis of gastric cancer." BMC Cancer **16**(1): 794.

Feng, S., Z. Cao and X. Wang (2013). "Role of aryl hydrocarbon receptor in cancer." Biochim Biophys Acta **1836**(2): 197-210.

Ferreiros-Vidal, I., T. Carroll, B. Taylor, A. Terry, Z. Liang, L. Bruno, G. Dharmalingam, S. Khadayate, B. S. Cobb, S. T. Smale, M. Spivakov, P. Srivastava, E. Petretto, A. G. Fisher and M. Merkenschlager (2013). "Genome-wide identification of Ikaros targets elucidates its contribution to mouse B-cell lineage specification and pre-B-cell differentiation." Blood **121**(10): 1769-1782.

- Francis, O. L., J. L. Payne, R. J. Su and K. J. Payne (2011). "Regulator of myeloid differentiation and function: The secret life of Ikaros." World J Biol Chem **2**(6): 119-125.
- Gao, Q., W. Liu, J. Cai, M. Li, Y. Gao, W. Lin and Z. Li (2014). EphB2 promotes cervical cancer progression by inducing epithelial-mesenchymal transition.
- Gates, L. A., C. E. Foulds and B. W. O'Malley (2017). "Histone Marks in the 'Driver's Seat': Functional Roles in Steering the Transcription Cycle." Trends in Biochemical Sciences **42**(12): 977-989.
- Geimer Le Lay, A. S., A. Oravecz, J. Mastio, C. Jung, P. Marchal, C. Ebel, D. Dembele, B. Jost, S. Le Gras, C. Thibault, T. Borggreffe, P. Kastner and S. Chan (2014). "The tumor suppressor Ikaros shapes the repertoire of notch target genes in T cells." Sci Signal **7**(317): ra28.
- Georgopoulos, K. (2017). "The making of a lymphocyte: the choice among disparate cell fates and the IKAROS enigma." Genes Dev **31**(5): 439-450.
- Georgopoulos, K., D. D. Moore and B. Derfler (1992). "Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment." Science **258**(5083): 808-812.
- Geyer, C. R. (2010). "Strategies to re-express epigenetically silenced p15(INK4b) and p21(WAF1) genes in acute myeloid leukemia." Epigenetics **5**(8): 696-703.
- Gilbert, H. S., V. Praloran and E. R. Stanley (1989). "Increased circulating CSF-1 (M-CSF) in myeloproliferative disease: association with myeloid metaplasia and peripheral bone marrow extension." Blood **74**(4): 1231-1234.

Goardon, N., J. A. Lambert, P. Rodriguez, P. Nissaire, S. Herblot, P. Thibault, D. Dumenil, J. Strouboulis, P.-H. Romeo and T. Hoang (2006). "ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis." The EMBO journal **25**(2): 357-366.

Gorospe, M., X. Wang and N. J Holbrook (1999). Functional role of p21 during the cellular response to stress.

Goyette, M. A., S. Duhamel, L. Aubert, A. Pelletier, P. Savage, M. P. Thibault, R. M. Johnson, P. Carmeliet, M. Basik, L. Gaboury, W. J. Muller, M. Park, P. P. Roux, J. P. Gratton and J. F. Cote (2018). "The Receptor Tyrosine Kinase AXL Is Required at Multiple Steps of the Metastatic Cascade during HER2-Positive Breast Cancer Progression." Cell Rep **23**(5): 1476-1490.

Guimaraes, L., G. D. G. Rocha, R. M. Queiroz, C. A. Martins, C. M. Takiya and C. R. Gattass (2017). "Pomolic acid induces apoptosis and inhibits multidrug resistance protein MRP1 and migration in glioblastoma cells." Oncol Rep **38**(4): 2525-2534.

Guo, D. L., J. Zhang, S. T. Yuen, W. Y. Tsui, A. S. Chan, C. Ho, J. Ji, S. Y. Leung and X. Chen (2006). "Reduced expression of EphB2 that parallels invasion and metastasis in colorectal tumours." Carcinogenesis **27**(3): 454-464.

Gurrapu, S., E. Pupo, G. Franzolin, L. Lanzetti and L. Tamagnone (2018). "Sema4C/PlexinB2 signaling controls breast cancer cell growth, hormonal dependence and tumorigenic potential." Cell Death Differ **25**(7): 1259-1275.

Heinrichs, S. K. M., T. Hess, J. Becker, L. Hamann, Y. K. Vashist, K. Butterbach, T. Schmidt, H. Alakus, I. Krasniuk, A. Höblinger, P. Lingohr, M. Ludwig, A. F. Hagel, C. W. Schildberg, L. Veits, U. Gyvyte, K. Weise, V. Schüller, A. C. Böhmer, J. Schröder, J. Gehlen, N. Kreuser, S. Hofer, H. Lang, F. Lordick, P. Malfertheiner, M. Moehler, O. Pech, N. Vassos, E.

Rodermann, J. R. Izbicki, M. Kruschewski, K. Ott, R. R. Schumann, M. Vieth, E. Mangold, E. Gasenko, L. Kupcinkas, H. Brenner, P. Grimminger, L. Bujanda, F. Sopena, J. Espinel, C. Thomson, Á. Pérez-Aísa, R. Campo, F. Geijo, D. Collette, C. Bruns, K. Messerle, I. Gockel, M. M. Nöthen, H. Lippert, K. Ridwelski, A. Lanas, G. Keller, M. Knapp, M. Leja, J. Kupcinkas, M. A. García-González, M. Venerito and J. Schumacher (2018). "Evidence for PTGER4, PSCA, and MBOAT7 as risk genes for gastric cancer on the genome and transcriptome level." Cancer medicine **7**(10): 5057-5065.

Higuchi, K., M. Inokuchi, Y. Takagi, T. Ishikawa, S. Otsuki, H. Uetake, K. Kojima and T. Kawano (2017). "Cadherin 5 expression correlates with poor survival in human gastric cancer." J Clin Pathol **70**(3): 217-221.

Hiken, J. F., J. I. McDonald, K. F. Decker, C. Sanchez, J. Hoog, N. D. VanderKraats, K. L. Jung, M. Akinhanmi, L. E. Rois, M. J. Ellis and J. R. Edwards (2017). "Epigenetic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes resistance to endocrine therapy for breast cancer." Oncogene **36**(16): 2319-2327.

Hodson, D. J., M. L. Janas, A. Galloway, S. E. Bell, S. Andrews, C. M. Li, R. Pannell, C. W. Siebel, H. R. MacDonald, K. De Keersmaecker, A. A. Ferrando, G. Grutz and M. Turner (2010). "Deletion of the RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 leads to perturbed thymic development and T lymphoblastic leukemia." Nat Immunol **11**(8): 717-724.

Hong, C. C., J. D. Lay, J. S. Huang, A. L. Cheng, J. L. Tang, M. T. Lin, G. M. Lai and S. E. Chuang (2008). "Receptor tyrosine kinase AXL is induced by chemotherapy drugs and overexpression of AXL confers drug resistance in acute myeloid leukemia." Cancer Lett **268**(2): 314-324.

Hong, Q., C. I. Sze, S. R. Lin, M. H. Lee, R. Y. He, L. Schultz, J. Y. Chang, S. J. Chen, R. J. Boackle, L. J. Hsu and N. S. Chang (2009). "Complement C1q activates tumor suppressor WWOX to induce apoptosis in prostate cancer cells." PLoS One **4**(6): e5755.

Hsu, W.-M., M.-I. Che, Y.-F. Liao, H.-H. Chang, C.-H. Chen, Y.-M. Huang, Y.-M. Jeng, J. Huang, M. J. Quon, H. Lee, H.-C. Huang and M.-C. Huang (2011). "B4GALNT3 expression predicts a favorable prognosis and suppresses cell migration and invasion via β_1 integrin signaling in neuroblastoma." The American journal of pathology **179**(3): 1394-1404.

Huang, W., Z. Chen, X. Shang, D. Tian, D. Wang, K. Wu, D. Fan and L. Xia (2015). "Sox12, a direct target of FoxQ1, promotes hepatocellular carcinoma metastasis through up-regulating Twist1 and FGFBP1." Hepatology **61**(6): 1920-1933.

Huang, X., Y. Wang, X. Nan, S. He, X. Xu, X. Zhu, J. Tang, X. Yang, L. Yao, X. Wang and C. Cheng-Chun (2013). The role of the orphan G protein-coupled receptor 37 (GPR37) in multiple myeloma cells.

Huang, Y., J. Hale, Y. Wang, W. Li, S. Zhang, J. Zhang, H. Zhao, X. Guo, J. Liu, H. Yan, K. Yazdanbakhsh, G. Huang, C. D. Hillyer, N. Mohandas, L. Chen, L. Sun and X. An (2018). "SF3B1 deficiency impairs human erythropoiesis via activation of p53 pathway: implications for understanding of ineffective erythropoiesis in MDS." J Hematol Oncol **11**(1): 19.

Huusko, P., D. Ponciano-Jackson, M. Wolf, J. A. Kiefer, D. O. Azorsa, S. Tuzmen, D. Weaver, C. Robbins, T. Moses, M. Allinen, S. Hautaniemi, Y. Chen, A. Elkahloun, M. Basik, G. S. Bova, L. Bubendorf, A. Lugli, G. Sauter, J. Schleutker, H. Ozelik, S. Elowe, T. Pawson, J. M. Trent, J. D. Carpten, O. P. Kallioniemi and S. Mousses (2004). "Nonsense-mediated decay microarray analysis identifies mutations of EPHB2 in human prostate cancer." Nat Genet **36**(9): 979-983.

Iacobucci, I., A. Lonetti, F. Messa, D. Cilloni, F. Arruga, E. Ottaviani, S. Paolini, C. Papayannidis, P. P. Piccaluga, P. Giannoulia, S. Soverini, M. Amabile, A. Poerio, G. Saglio, F. Pane, G. Berton, A. Baruzzi, A. Vitale, S. Chiaretti, G. Perini, R. Foà, M. Baccarani and G. Martinelli (2008). "Expression of spliced oncogenic Ikaros isoforms in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: implications for a new mechanism of resistance." Blood **112**(9): 3847.

Ikai, T., H. Miwa, M. Shikami, A. Hiramatsu, E. Tajima, H. Yamamoto, N. Imai, A. Hattori, K. Nishii, K. Miura, A. Satoh, M. Itoh, A. Imamura, H. Mihara, Y. Katoh and M. Nitta (2005). "Placenta growth factor stimulates the growth of Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia cells by both autocrine and paracrine pathways." Eur J Haematol **75**(4): 273-279.

Imaoka, T., T. Okutani, K. Daino, D. Iizuka, M. Nishimura and Y. Shimada (2014). "Overexpression of NOTCH-regulated ankyrin repeat protein is associated with breast cancer cell proliferation." Anticancer Res **34**(5): 2165-2171.

Inokuchi, M., K. Higuchi, Y. Takagi, T. Tanioka, M. Nakagawa, K. Gokita, K. Okuno and K. Kojima (2017). "Cadherin 5 Is a Significant Risk Factor for Hematogenous Recurrence and a Prognostic Factor in Locally Advanced Gastric Cancer." Anticancer Res **37**(12): 6807-6813.

Jain, A. K., K. Raina and R. Agarwal (2013). "Deletion of p21/Cdkn1a confers protective effect against prostate tumorigenesis in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model." Cell Cycle **12**(10): 1598-1604.

Jang, I., B. T. Jeon, E. A. Jeong, E.-J. Kim, D. Kang, J. S. Lee, B. G. Jeong, J. H. Kim, B. H. Choi, J. E. Lee, J. W. Kim, J. Y. Choi and G. S. Roh (2012). "Pak1/LIMK1/Cofilin Pathway Contributes to Tumor Migration and Invasion in Human Non-Small Cell Lung Carcinomas

and Cell Lines." The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology **16**(3): 159-165.

Janning, M., I. Ben-Batalla and S. Loges (2015). "Axl inhibition: a potential road to a novel acute myeloid leukemia therapy?" Expert Rev Hematol **8**(2): 135-138.

Janowska-Wieczorek, A., A. R. Belch, A. Jacobs, D. Bowen, R. A. Padua, E. Paietta and E. R. Stanley (1991). "Increased circulating colony-stimulating factor-1 in patients with preleukemia, leukemia, and lymphoid malignancies." Blood **77**(8): 1796-1803.

Jeannet, R., J. Mastio, A. Macias-Garcia, A. Oravec, T. Ashworth, A.-S. Geimer Le Lay, B. Jost, S. Le Gras, J. Ghysdael, T. Gridley, T. Honjo, F. Radtke, J. C. Aster, S. Chan and P. Kastner (2010). "Oncogenic activation of the *Notch1* gene by deletion of its promoter in Ikaros-deficient T-ALL." Blood **116**(25): 5443.

Jeon, H. S., T. Dracheva, S. H. Yang, D. Meerzaman, J. Fukuoka, A. Shakoori, K. Shilo, W. D. Travis and J. Jen (2008). "SMAD6 contributes to patient survival in non-small cell lung cancer and its knockdown reestablishes TGF-beta homeostasis in lung cancer cells." Cancer Res **68**(23): 9686-9692.

Jiang, L., Y. Xu, X. Zeng, J. Fang, H. C. Morse, 3rd and J. X. Zhou (2015). "Suppression of CD300A inhibits the growth of diffuse large B-cell lymphoma." Oncotarget **6**(31): 31191-31202.

Jiang, Z., D. Wu, S. Lin and P. Li (2016). "CD34 and CD38 are prognostic biomarkers for acute B lymphoblastic leukemia." Biomark Res **4**: 23.

Jin, H., Y. Yu, T. Zhang, X. Zhou, J. Zhou, L. Jia, Y. Wu, B. P. Zhou and Y. Feng (2010). "Snail is critical for tumor growth and metastasis of ovarian carcinoma." Int J Cancer **126**(9): 2102-2111.

Jin, L., W.-R. Liu, M.-X. Tian, X.-F. Jiang, H. Wang, P.-Y. Zhou, Z.-B. Ding, Y.-F. Peng, Z. Dai, S.-J. Qiu, J. Zhou, J. Fan and Y.-H. Shi (2016). "CCL24 contributes to HCC malignancy via RhoB- VEGFA-VEGFR2 angiogenesis pathway and indicates poor prognosis." Oncotarget **8**(3): 5135-5148.

Jubb, A. M., F. Zhong, S. Bheddah, H. I. Grabsch, G. D. Frantz, W. Mueller, V. Kavi, P. Quirke, P. Polakis and H. Koeppen (2005). "EphB2 is a prognostic factor in colorectal cancer." Clin Cancer Res **11**(14): 5181-5187.

Kaneda, A., K. Wakazono, T. Tsukamoto, N. Watanabe, Y. Yagi, M. Tatematsu, M. Kaminishi, T. Sugimura and T. Ushijima (2004). "Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers." Cancer Res **64**(18): 6410-6415.

Kanlikilicer, P., B. Ozpolat, B. Aslan, R. Bayraktar, N. Gurbuz, C. Rodriguez-Aguayo, E. Bayraktar, M. Denizli, V. Gonzalez-Villasana, C. Ivan, G. L. R. Lokesh, P. Amero, S. Catuogno, M. Haemmerle, S. Y. Wu, R. Mitra, D. G. Gorenstein, D. E. Volk, V. de Franciscis, A. K. Sood and G. Lopez-Berestein (2017). "Therapeutic Targeting of AXL Receptor Tyrosine Kinase Inhibits Tumor Growth and Intraperitoneal Metastasis in Ovarian Cancer Models." Mol Ther Nucleic Acids **9**: 251-262.

Karimian, A., Y. Ahmadi and B. Yousefi (2016). "Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage." DNA Repair (Amst) **42**: 63-71.

Karni-Schmidt, O., M. Lokshin and C. Prives (2016). "The Roles of MDM2 and MDMX in Cancer." Annu Rev Pathol **11**: 617-644.

Kathrein, K. L., S. Chari and S. Winandy (2008). "Ikaros directly represses the notch target gene Hes1 in a leukemia T cell line: implications for CD4 regulation." J Biol Chem **283**(16): 10476-10484.

Kaur, A., S. H. A. Sultan, V. Murugaiah, A. A. Pathan, F. S. Alhamlan, E. Karteris and U. Kishore (2016). "Human C1q Induces Apoptosis in an Ovarian Cancer Cell Line via Tumor Necrosis Factor Pathway." Frontiers in immunology **7**: 599-599.

Ke, C., Y. Ren, L. Lv, W. Hu and W. Zhou (2017). "Association between CXCL16/CXCR6 expression and the clinicopathological features of patients with non-small cell lung cancer." Oncology letters **13**(6): 4661-4668.

Keys, J. R., M. R. Tallack, Y. Zhan, P. Papathanasiou, C. C. Goodnow, K. M. Gaensler, M. Crossley, J. Dekker and A. C. Perkins (2008). "A mechanism for Ikaros regulation of human globin gene switching." Br J Haematol **141**(3): 398-406.

Kim, T. H. and S. G. Cho (2017). "Kisspeptin inhibits cancer growth and metastasis via activation of EIF2AK2." Mol Med Rep **16**(5): 7585-7590.

Kirschmann, D. A., E. A. Seftor, S. F. Fong, D. R. Nieva, C. M. Sullivan, E. M. Edwards, P. Sommer, K. Csiszar and M. J. Hendrix (2002). "A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion." Cancer Res **62**(15): 4478-4483.

Kleeff, J., H. Maruyama, H. Friess, M. W. Buchler, D. Falb and M. Korc (1999). "Smad6 suppresses TGF-beta-induced growth inhibition in COLO-357 pancreatic cancer cells and is overexpressed in pancreatic cancer." Biochem Biophys Res Commun **255**(2): 268-273.

Kleinmann, E., A. S. Geimer Le Lay, M. Sellars, P. Kastner and S. Chan (2008). "Ikaros represses the transcriptional response to Notch signaling in T-cell development." Mol Cell Biol **28**(24): 7465-7475.

Krebs, L. T., M. L. Deftos, M. J. Bevan and T. Gridley (2001). "The Nrarp gene encodes an ankyrin-repeat protein that is transcriptionally regulated by the notch signaling pathway." Dev Biol **238**(1): 110-119.

Krejci, A. and S. Bray (2007). "Notch activation stimulates transient and selective binding of Su(H)/CSL to target enhancers." Genes Dev **21**(11): 1322-1327.

Krig, S. R., S. Fietze, C. Simion, J. K. Miller, W. H. D. Fry, H. Rafidi, L. Kotelawala, L. Qi, O. L. Griffith, J. W. Gray, K. L. Carraway and C. Sweeney (2011). "Lrig1 Is an Estrogen-Regulated Growth Suppressor and Correlates with Longer Relapse-Free Survival in ER α -Positive Breast Cancer." Molecular Cancer Research **9**(10): 1406.

Kundu, A., E.-Y. Kho, S. B. Shelar, H. Nam, G. Brinkley, S. Darshan, Y. Tang, R. Kirkman, D. K. Crossman, S. Varambally, G. C. Rowe, S. Wei, P. Buckhaults and S. Sudarshan (2018). "Abstract 4483: Functional implications of PRDM16 loss in kidney cancer." Cancer Research **78**(13 Supplement): 4483.

Kutlesa, S., J. Zayas, A. Valle, R. B. Levy and R. Jurecic (2009). "T-cell differentiation of multipotent hematopoietic cell line EML in the OP9-DL1 coculture system." Exp Hematol **37**(8): 909-923.

Lee-Sherick, A. B., K. M. Eisenman, S. Sather, A. McGranahan, P. M. Armistead, C. S. McGary, S. A. Hunsucker, J. Schlegel, H. Martinson, C. Cannon, A. K. Keating, H. S. Earp, X. Liang, D. DeRyckere and D. K. Graham (2013). "Aberrant Mer receptor tyrosine kinase expression contributes to leukemogenesis in acute myeloid leukemia." Oncogene **32**(46): 5359-5368.

Lehrer, S., P. H. Rheinstein and K. E. Rosenzweig (2018). "Glioblastoma Multiforme: Fewer Tumor Copy Number Segments of the SGK1 Gene Are Associated with Poorer Survival." Cancer Genomics Proteomics **15**(4): 273-278.

Lei, S.-t., F. Shen, J.-w. Chen, J.-h. Feng, W.-s. Cai, L. Shen, Z.-w. Hu and B. Xu (2016). "MiR-639 promoted cell proliferation and cell cycle in human thyroid cancer by suppressing CDKN1A expression." Biomedicine & Pharmacotherapy **84**: 1834-1840.

Li, S., C. Wang, X. Yu, H. Wu, J. Hu, S. Wang and Z. Ye (2017). "miR-3619-5p inhibits prostate cancer cell growth by activating CDKN1A expression." Oncol Rep **37**(1): 241-248.

Liang, X., C. Lan, G. Jiao, W. Fu, X. Long, Y. An, K. Wang, J. Zhou, T. Chen, Y. Li, J. Xu, Q. Huang, B. Xu and J. Xiao (2017). "Therapeutic inhibition of SGK1 suppresses colorectal cancer." Experimental & Molecular Medicine **49**: e399.

Liao, S., S. Xiao, H. Chen, M. Zhang, Z. Chen, Y. Long, L. Gao, G. Zhu, J. He, S. Peng, W. Xiong, Z. Zeng, Z. Li, M. Zhou, X. Li, J. Ma, M. Wu, J. Xiang, G. Li and Y. Zhou (2017). "CD38 enhances the proliferation and inhibits the apoptosis of cervical cancer cells by affecting the mitochondria functions." Mol Carcinog **56**(10): 2245-2257.

Liao, S., S. Xiao, G. Zhu, D. Zheng, J. He, Z. Pei, G. Li and Y. Zhou (2014). "CD38 is highly expressed and affects the PI3K/Akt signaling pathway in cervical cancer." Oncol Rep **32**(6): 2703-2709.

Liao, Y., J. Chen, J. Ma, Q. Mao, R. Wei and J. Zheng (2018). "Notch-regulated ankyrin-repeat protein is a novel tissue biomarker that predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer." Oncology letters **16**(2): 1885-1891.

Ling, B., K. Watt, S. Banerjee, D. Newsted, P. Truesdell, J. Adams, S. S. Sidhu and A. W. B. Craig (2017). "A novel immunotherapy targeting MMP-14 limits hypoxia, immune

suppression and metastasis in triple-negative breast cancer models." Oncotarget **8**(35): 58372-58385.

Liu, F., C. Zhu, X. Huang, J. Cai, H. Wang, X. Wang, S. He, C. Liu, X. Yang, Y. Zhang and T. Zhang (2014). "A low level of GPR37 is associated with human hepatocellular carcinoma progression and poor patient survival." Pathol Res Pract **210**(12): 885-892.

Liu, H., X. Wu, J. Huang, J. Peng and L. Guo (2015). "miR-7 modulates chemoresistance of small cell lung cancer by repressing MRP1/ABCC1." Int J Exp Pathol **96**(4): 240-247.

Liu, W., H. Wei, Z. Gao, G. Chen, Y. Liu, X. Gao, G. Bai, S. He, T. Liu, W. Xu, X. Yang, J. Jiao and J. Xiao (2018). "COL5A1 may contribute the metastasis of lung adenocarcinoma." Gene **665**: 57-66.

Liu, X., T. R. Grogan, H. Hieronymus, T. Hashimoto, J. Mottahedeh, D. Cheng, L. Zhang, K. Huang, T. Stoyanova, J. W. Park, R. O. Shkhyan, B. Nowroozizadeh, M. B. Rettig, C. L. Sawyers, D. Elashoff, S. Horvath, J. Huang, O. N. Witte and A. S. Goldstein (2016). "Low CD38 Identifies Progenitor-like Inflammation-Associated Luminal Cells that Can Initiate Human Prostate Cancer and Predict Poor Outcome." Cell Rep **17**(10): 2596-2606.

Liu, Y., J. Deng, L. Wang, H. Lee, B. Armstrong, A. Scuto, C. Kowolik, L. M. Weiss, S. Forman and H. Yu (2012). "S1PR1 is an effective target to block STAT3 signaling in activated B cell-like diffuse large B-cell lymphoma." Blood **120**(7): 1458-1465.

Loh, X. Y., L. W. Ding and H. P. Koeffler (2017). "Abstract 4494: Tumor suppressive role of ZFP36L1 by suppressing HIF1 α and Cyclin D1 in bladder and breast cancer." Cancer Research **77**(13 Supplement): 4494.

Lopez, R. A., S. Schoetz, K. DeAngelis, D. O'Neill and A. Bank (2002). "Multiple hematopoietic defects and delayed globin switching in Ikaros null mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 602-607.

Luo, J., C. Zhang, C. Wang, L. Li, C. Li, Q. Li, M. Zhang and Q. Wu (2016). "Miz-1 promotes the proliferation of esophageal cancer cells via suppression of p21 and release of p21-arrested cyclin D1." Oncol Rep **35**(6): 3532-3540.

MacLaine, N. J. and T. R. Hupp (2009). "The regulation of p53 by phosphorylation: a model for how distinct signals integrate into the p53 pathway." Aging **1**(5): 490-502.

Macleod, K. F., N. Sherry, G. Hannon, D. Beach, T. Tokino, K. Kinzler, B. Vogelstein and T. Jacks (1995). "p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage." Genes Dev **9**(8): 935-944.

Malinge, S., C. Thiollier, T. M. Chlon, L. C. Dore, L. Diebold, O. Bluteau, V. Mabilah, W. Vainchenker, P. Dessen, S. Winandy, T. Mercher and J. D. Crispino (2013). "Ikaros inhibits megakaryopoiesis through functional interaction with GATA-1 and NOTCH signaling." Blood **121**(13): 2440-2451.

Mangone, F. R. R., F. Walder, S. Maistro, F. S. Pasini, C. N. Lehn, M. B. Carvalho, M. M. Brentani, I. Snitcovsky and M. H. H. Federico (2010). "Smad2 and Smad6 as predictors of overall survival in oral squamous cell carcinoma patients." Molecular Cancer **9**(1): 106.

Manna, A., L. J. Lewis-Tuffin, S. Ailawadhi, A. A. Chanan-Khan and A. Paulus (2018). "Using anti-CD38 immunotherapy to enhance anti-tumor T-cell immunity in chronic lymphocytic leukemia (CLL)." The Journal of Immunology **200**(1 Supplement): 58.17.

Mansouri, L., D. Noerenberg, E. Young, E. Mylonas, M. Abdulla, M. Frick, F. Asmar, V. Ljungstrom, M. Schneider, K. Yoshida, A. Skaftason, T. Pandzic, B. Gonzalez, A. Tasidou, N.

Waldhueter, A. Rivas-Delgado, M. Angelopoulou, M. Ziepert, C. M. Arends, L. Couronne, D. Lenze, C. D. Baldus, C. Bastard, J. Okosun, J. Fitzgibbon, B. Dorken, H. G. Drexler, D. Roos-Weil, C. A. Schmitt, H. D. Munch-Petersen, T. Zenz, M. L. Hansmann, J. C. Strefford, G. Enblad, O. A. Bernard, E. Ralfkiaer, M. Erlanson, P. Korkolopoulou, M. Hultdin, T. Papadaki, K. Gronbaek, A. Lopez-Guillermo, S. Ogawa, R. Kupperts, K. Stamatopoulos, N. Stavroyianni, G. Kanellis, A. Rosenwald, E. Campo, R. M. Amini, G. Ott, T. P. Vassilakopoulos, M. Hummel, R. Rosenquist and F. Damm (2016). "Frequent NFKBIE deletions are associated with poor outcome in primary mediastinal B-cell lymphoma." Blood **128**(23): 2666-2670.

Mansouri, L., L.-A. Sutton, V. Ljungström, S. Bondza, L. Arngården, S. Bhoi, J. Larsson, D. Cortese, A. Kalushkova, K. Plevova, E. Young, R. Gunnarsson, E. Falk-Sörqvist, P. Lönn, A. F. Muggen, X.-J. Yan, B. Sander, G. Enblad, K. E. Smedby, G. Juliusson, C. Belessi, J. Rung, N. Chiorazzi, J. C. Strefford, A. W. Langerak, S. Pospisilova, F. Davi, M. Hellström, H. Jernberg-Wiklund, P. Ghia, O. Söderberg, K. Stamatopoulos, M. Nilsson and R. Rosenquist (2015). "Functional loss of I κ B ϵ leads to NF- κ B deregulation in aggressive chronic lymphocytic leukemia." The Journal of Experimental Medicine **212**(6): 833.

Mao, F., C. Holmlund, M. Faraz, W. Wang, T. Bergenheim, S. Kvarnbrink, M. Johansson, R. Henriksson and H. Hedman (2018). "Lrig1 is a haploinsufficient tumor suppressor gene in malignant glioma." Oncogenesis **7**(2): 13-13.

Mao, X. G., X. Y. Xue, L. Wang, X. Zhang, M. Yan, Y. Y. Tu, W. Lin, X. F. Jiang, H. G. Ren, W. Zhang and S. J. Song (2013). "CDH5 is specifically activated in glioblastoma stemlike cells and contributes to vasculogenic mimicry induced by hypoxia." Neuro Oncol **15**(7): 865-879.

Matsuura, S., R. Mi, M. Koupenova, A. Eliades, S. Patterson, P. Toselli, J. Thon, J. E. Italiano, P. C. Trackman, N. Papadantonakis and K. Ravid (2016). "Lysyl oxidase is associated with increased thrombosis and platelet reactivity." Blood **127**(11): 1493.

McElwee, J., S. Mohanan, O. Griffith, H. Breuer, L. Anguish, B. Cherrington, A. M Palmer, L. Howe, V. Subramanian, C. Causey, P. Thompson, J. Gray and S. Coonrod (2012). Identification of PADI2 as a potential breast cancer biomarker and therapeutic target.

McElwee, J. L., S. Mohanan, S. Horibata, K. L. Sams, L. J. Anguish, D. McLean, I. Cvitas, J. J. Wakshlag and S. A. Coonrod (2014). "PAD2 overexpression in transgenic mice promotes spontaneous skin neoplasia." Cancer Res **74**(21): 6306-6317.

McNee, G., K. L. Eales, W. Wei, D. S. Williams, A. Barkhuizen, D. B. Bartlett, S. Essex, S. Anandram, A. Filer, P. A. H. Moss, G. Pratt, S. Basu, C. C. Davies and D. A. Tennant (2016). "Citruination of histone H3 drives IL-6 production by bone marrow mesenchymal stem cells in MGUS and multiple myeloma." Leukemia **31**: 373.

Melillo, L., N. Cascavilla, G. Lombardi, M. Carotenuto and P. Musto (1992). "Prognostic relevance of serum beta 2-microglobulin in acute myeloid leukemia." Leukemia **6**(10): 1076-1078.

Miccio, A., Y. Wang, W. Hong, G. D. Gregory, H. Wang, X. Yu, J. K. Choi, S. Shelat, W. Tong, M. Poncz and G. A. Blobel (2010). "NuRD mediates activating and repressive functions of GATA-1 and FOG-1 during blood development." EMBO J **29**(2): 442-456.

Morita, T., K. Shibata, F. Kikkawa, H. Kajiyama, K. Ino and S. Mizutani (2004). "Oxytocin inhibits the progression of human ovarian carcinoma cells in vitro and in vivo." Int J Cancer **109**(4): 525-532.

Mullican, S. E., S. Zhang, M. Konopleva, V. Ruvolo, M. Andreeff, J. Milbrandt and O. M. Conneely (2007). "Abrogation of nuclear receptors Nr4a3 and Nr4a1 leads to development of acute myeloid leukemia." Nat Med **13**(6): 730-735.

Murn, J., O. Alibert, N. Wu, S. Tendil and X. Gidrol (2008). "Prostaglandin E2 regulates B cell proliferation through a candidate tumor suppressor, Ptger4." J Exp Med **205**(13): 3091-3103.

Nekhai, S., M. Petukhov and D. Breuer (2014). "Regulation of CDK9 activity by phosphorylation and dephosphorylation." Biomed Res Int **2014**: 964964.

Ng, P. K. S., C. P. Y. Lau, E. K. Y. Lam, S. S. K. Li, V. W. Y. Lui, W. Yeo, Y. K. Ng, P. B. S. Lai and S. K. W. Tsui (2018). "Hypermethylation of NF- κ B-Activating Protein-Like (NKAPL) Promoter in Hepatocellular Carcinoma Suppresses Its Expression and Predicts a Poor Prognosis." Digestive diseases and sciences **63**(3): 676-686.

Ng, S. Y., T. Yoshida, J. Zhang and K. Georgopoulos (2009). "Genome-wide lineage-specific transcriptional networks underscore Ikaros-dependent lymphoid priming in hematopoietic stem cells." Immunity **30**(4): 493-507.

Nichogiannopoulou, A., M. Trevisan, S. Neben, C. Friedrich and K. Georgopoulos (1999). "Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice." J Exp Med **190**(9): 1201-1214.

Nicke, B., J. Bastien, S. J. Khanna, P. H. Warne, V. Cowling, S. J. Cook, G. Peters, O. Delpuech, A. Schulze, K. Berns, J. Mullenders, R. L. Beijersbergen, R. Bernards, T. S. Ganesan, J. Downward and D. C. Hancock (2005). "Involvement of MINK, a Ste20 Family Kinase, in Ras Oncogene-Induced Growth Arrest in Human Ovarian Surface Epithelial Cells." Molecular Cell **20**(5): 673-685.

Nishikata, I., H. Sasaki, M. Iga, Y. Tateno, S. Imayoshi, N. Asou, T. Nakamura and K. Morishita (2003). "A novel EVI1 gene family, MEL1, lacking a PR domain (MEL1S) is expressed mainly in t(1;3)(p36;q21)-positive AML and blocks G-CSF-induced myeloid differentiation." Blood **102**(9): 3323-3332.

O'Neill, D. W., S. S. Schoetz, R. A. Lopez, M. Castle, L. Rabinowitz, E. Shor, D. Krawchuk, M. G. Goll, M. Renz, H. P. Seelig, S. Han, R. H. Seong, S. D. Park, T. Agalioti, N. Munshi, D. Thanos, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and A. Bank (2000). "An ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells." Mol Cell Biol **20**(20): 7572-7582.

Ohkoshi, S., M. Yano and Y. Matsuda (2015). "Oncogenic role of p21 in hepatocarcinogenesis suggests a new treatment strategy." World journal of gastroenterology **21**(42): 12150-12156.

Oravec, A., A. Apostolov, K. Polak, B. Jost, S. Le Gras, S. Chan and P. Kastner (2015). "Ikaros mediates gene silencing in T cells through Polycomb repressive complex 2." Nat Commun **6**: 8823.

Orlacchio, A., M. Ranieri, M. Brave, V. A. Arciuch, T. Forde, D. De Martino, K. E. Anderson, P. Hawkins and A. Di Cristofano (2017). "SGK1 Is a Critical Component of an AKT-Independent Pathway Essential for PI3K-Mediated Tumor Development and Maintenance." Cancer Res **77**(24): 6914-6926.

Oswald, F., B. Täuber, T. Dobner, S. Bourteele, U. Kostezka, G. Adler, S. Liptay and R. M. Schmid (2001). "p300 Acts as a Transcriptional Coactivator for Mammalian Notch-1." Molecular and Cellular Biology **21**(22): 7761.

Pajcini, K. V., N. A. Speck and W. S. Pear (2011). "Notch signaling in mammalian hematopoietic stem cells." Leukemia **25**(10): 1525-1532.

Pajcini, K. V., L. Xu, L. Shao, J. Petrovic, K. Palasiewicz, Y. Ohtani, W. Bailis, C. Lee, G. B. Wertheim, R. Mani, N. Muthusamy, Y. Li, J. P. P. Meijerink, S. C. Blacklow, R. B. Faryabi, S. Cherry and W. S. Pear (2017). "MAFB enhances oncogenic Notch signaling in T cell acute lymphoblastic leukemia." Science Signaling **10**(505): eaam6846.

Pandey, R., R. Mali, A. Chatterjee, F. Paublant, R. Prudent, L. Lafanechere and R. Kapur (2015). "Role of LIM Kinase in Oncogenic Signaling from FLT3 and KIT Receptors and Its Targeting in Myeloid Leukemia." Blood **126**(23): 1257.

Papetti, M., S. N. Wontakal, T. Stopka and A. I. Skoultchi (2010). "GATA-1 directly regulates p21 gene expression during erythroid differentiation." Cell Cycle **9**(10): 1972-1980.

Paprocka, M., A. Bielawska-Pohl, J. Rossowska, A. Krawczyński, D. Dus, M. Kielbinski, O. Haus, M. Podolak-Dawidziak and K. Kuliczowski (2017). "MRP1 protein expression in leukemic stem cells as a negative prognostic marker in acute myeloid leukemia patients." Eur J Haematol **99**(5): 415-422.

Parr, C., G. Watkins, M. Boulton, J. Cai and W. G. Jiang (2005). "Placenta growth factor is over-expressed and has prognostic value in human breast cancer." Eur J Cancer **41**(18): 2819-2827.

Patrussi, L., N. Capitani, V. Martini, M. Pizzi, V. Trimarco, F. Frezzato, F. Marino, G. Semenzato, L. Trentin and C. T. Baldari (2015). "Enhanced Chemokine Receptor Recycling and Impaired S1P1 Expression Promote Leukemic Cell Infiltration of Lymph Nodes in Chronic Lymphocytic Leukemia." Cancer Res **75**(19): 4153-4163.

Peterlin, B. M. and D. H. Price (2006). "Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb." Mol Cell **23**(3): 297-305.

Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.

Ploeger, C., N. Waldburger, A. Fraas, B. Goeppert, S. Pusch, K. Breuhahn, X. W. Wang, P. Schirmacher and S. Roessler (2016). "Chromosome 8p tumor suppressor genes SH2D4A and SORBS3 cooperate to inhibit interleukin-6 signaling in hepatocellular carcinoma." Hepatology **64**(3): 828-842.

Pope, N. J. and E. H. Bresnick (2013). "Establishment of a Cell-Type-Specific Genetic Network by the Mediator Complex Component Med1." Molecular and Cellular Biology **33**(10): 1938.

Popescu, M., Z. Gurel, T. Ronni, C. Song, K. Y. Hung, K. J. Payne and S. Dovat (2009). "Ikaros stability and pericentromeric localization are regulated by protein phosphatase 1." J Biol Chem **284**(20): 13869-13880.

Powell, A. E., Y. Wang, Y. Li, E. J. Poulin, A. L. Means, M. K. Washington, J. N. Higginbotham, A. Juchheim, N. Prasad, S. E. Levy, Y. Guo, Y. Shyr, B. J. Aronow, K. M. Haigis, J. L. Franklin and R. J. Coffey (2012). "The pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor." Cell **149**(1): 146-158.

Ramirez-Herrick, A. M., S. E. Mullican, A. M. Sheehan and O. M. Conneely (2011). "Reduced NR4A gene dosage leads to mixed myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms in mice." Blood **117**(9): 2681-2690.

Rankin, E. B. and A. J. Giaccia (2016). "The Receptor Tyrosine Kinase AXL in Cancer Progression." Cancers (Basel) **8**(11).

Rayhman, O., E. Klipper, L. Muller, B. Davidson, R. Reich and R. Meidan (2008). "Small Interfering RNA Molecules Targeting Endothelin-Converting Enzyme-1 Inhibit Endothelin-1

Synthesis and the Invasive Phenotype of Ovarian Carcinoma Cells." Cancer Research **68**(22): 9265.

Raymond, A., B. Liu, H. Liang, C. Wei, M. Guindani, Y. Lu, S. Liang, L. S. St John, J. Molldrem and L. Nagarajan (2014). "A role for BMP-induced homeobox gene MIXL1 in acute myelogenous leukemia and identification of type I BMP receptor as a potential target for therapy." Oncotarget **5**(24): 12675-12693.

Ren, W., Y. Zhang, L. Zhang, Q. Lin, J. Zhang and G. Xu (2018). "Overexpression of collagen type V alpha1 chain in human breast invasive ductal carcinoma is mediated by TGF-beta1." Int J Oncol.

Reyes-Leon, A., R. Juarez-Velazquez, A. Medrano-Hernandez, T. Cuenca-Roldan, C. Salas-Labadia, M. Del Pilar Navarrete-Meneses, R. Rivera-Luna, G. Lopez-Hernandez, R. Paredes-Aguilera and P. Perez-Vera (2015). "Expression of Ik6 and Ik8 Isoforms and Their Association with Relapse and Death in Mexican Children with Acute Lymphoblastic Leukemia." PLoS One **10**(7): e0130756.

Richardsen, E., R. D. Uglehus, S. H. Johnsen and L. T. Busund (2015). "Macrophage-colony stimulating factor (CSF1) predicts breast cancer progression and mortality." Anticancer Res **35**(2): 865-874.

Ross, J., L. Mavoungou, E. H. Bresnick and E. Milot (2012). "GATA-1 utilizes Ikaros and polycomb repressive complex 2 to suppress Hes1 and to promote erythropoiesis." Mol Cell Biol **32**(18): 3624-3638.

Rylski, M., J. J. Welch, Y. Y. Chen, D. L. Letting, J. A. Diehl, L. A. Chodosh, G. A. Blobel and M. J. Weiss (2003). "GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation." Mol Cell Biol **23**(14): 5031-5042.

Sahoo, S., D. R. Brickley, M. Kocherginsky and S. D. Conzen (2005). "Coordinate expression of the PI3-kinase downstream effectors serum and glucocorticoid-induced kinase (SGK-1) and Akt-1 in human breast cancer." Eur J Cancer **41**(17): 2754-2759.

Sakai, I., T. Tamura, H. Narumi, N. Uchida, Y. Yakushijin, T. Hato, S. Fujita and M. Yasukawa (2005). "Novel RUNX1-PRDM16 fusion transcripts in a patient with acute myeloid leukemia showing t(1;21)(p36;q22)." Genes Chromosomes Cancer **44**(3): 265-270.

Sarwar, M., A. S. Syed Khaja, M. Aleskandarany, R. Karlsson, M. Althobiti, N. Ødum, N. P. Mongan, N. Dizayi, H. Johnson, A. R. Green, I. O. Ellis, E. A. Rakha and J. L. Persson (2018). "The role of PIP5K1 α /pAKT and targeted inhibition of growth of subtypes of breast cancer using PIP5K1 α inhibitor." Oncogene.

Schmitt, T. M. and J. C. Zuniga-Pflucker (2002). "Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro." Immunity **17**(6): 749-756.

Schwickert, T. A., H. Tagoh, S. Gultekin, A. Dakic, E. Axelsson, M. Minnich, A. Ebert, B. Werner, M. Roth, L. Cimmino, R. A. Dickins, J. Zuber, M. Jaritz and M. Busslinger (2014). "Stage-specific control of early B cell development by the transcription factor Ikaros." Nat Immunol **15**(3): 283-293.

Sedlakova, I., J. Laco, K. Caltova, M. Cervinka, J. Tosner, A. Rezac and J. Spacek (2015). "Clinical significance of the resistance proteins LRP, Pgp, MRP1, MRP3, and MRP5 in epithelial ovarian cancer." Int J Gynecol Cancer **25**(2): 236-243.

Semenas, J., A. Hedblom, R. R. Miftakhova, M. Sarwar, R. Larsson, L. Shcherbina, M. E. Johansson, P. Härkönen, O. Sterner and J. L. Persson (2014). "The role of PI3K/AKT-related PIP5K1 α and the discovery of its selective inhibitor for treatment of advanced prostate cancer." Proceedings of the National Academy of Sciences **111**(35): E3689.

Shih, Y. H., K. W. Chang, M. Y. Chen, C. C. Yu, D. J. Lin, S. M. Hsia, H. L. Huang and T. M. Shieh (2013). "Lysyl oxidase and enhancement of cell proliferation and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma." Head Neck **35**(2): 250-256.

Shin, T. H., C. Brynczka, F. Dayyani, M. N. Rivera and D. A. Sweetser (2016). "TLE4 regulation of wnt-mediated inflammation underlies its role as a tumor suppressor in myeloid leukemia." Leukemia research **48**: 46-56.

Shirvaikar, N., A. Jalili, I. Mirza, S. Ilnitsky, C. Korol, L. M. Larratt, A. R. Turner and A. Janowska-Wieczorek (2008). "MMP-14 Mediates Migration of Acute Myelogenous Leukemia Cells." Blood **112**(11): 2943.

Shtutman, M., B. D. Chang, G. P. Schools and E. V. Broude (2017). "Cellular Model of p21-Induced Senescence." Methods Mol Biol **1534**: 31-39.

Simon, M. C., L. Pevny, M. V. Wiles, G. Keller, F. Costantini and S. H. Orkin (1992). "Rescue of erythroid development in gene targeted GATA-1- mouse embryonic stem cells." Nat Genet **1**(2): 92-98.

Sinha, S., J. Boysen, M. Nelson, S. L. Warner, D. Bearss, N. E. Kay and A. K. Ghosh (2016). "Axl activates fibroblast growth factor receptor pathway to potentiate survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells." Leukemia **30**(6): 1431-1436.

Smollich, M., M. Gotte, G. W. Yip, E. S. Yong, C. Kersting, J. Fischgrabe, I. Radke, L. Kiesel and P. Wulfig (2007). "On the role of endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) and neprilysin in human breast cancer." Breast Cancer Res Treat **106**(3): 361-369.

Su, J., Y. Zhou, Z. Pan, L. Shi, J. Yang, A. Liao, Q. Liao and Q. Su (2017). "Downregulation of LIMK1-ADF/cofilin by DADS inhibits the migration and invasion of colon cancer." Scientific reports **7**: 45624-45624.

Su, Y., L. Lin, J. Zhang, Y. Jiang, C. Pan, L. Sun, J. Duan and W. Liao (2015). "Low expression of DLC1 is predictive of poor therapeutic efficiency of fluoropyrimidine and oxaliplatin as adjuvant chemotherapy in gastric cancer." Mol Med Rep **12**(4): 5771-5779.

Suk, F.-M., C.-C. Chang, R.-J. Lin, S.-Y. Lin, Y.-T. Chen and Y.-C. Liang (2018). "MCPIP3 as a Potential Metastasis Suppressor Gene in Human Colorectal Cancer." International journal of molecular sciences **19**(5): 1350.

Sun, L., P. A. Goodman, C. M. Wood, M. L. Crotty, M. Sensel, H. Sather, C. Navara, J. Nachman, P. G. Steinherz, P. S. Gaynon, N. Seibel, A. Vassilev, B. D. Juran, G. H. Reaman and F. M. Uckun (1999). "Expression of aberrantly spliced oncogenic ikaros isoforms in childhood acute lymphoblastic leukemia." J Clin Oncol **17**(12): 3753-3766.

Sun, X., S. Huang, X. Wang, X. Zhang and X. Wang (2018). "CD300A promotes tumor progression by PECAM1, ADCY7 and AKT pathway in acute myeloid leukemia." Oncotarget **9**(44): 27574-27584.

Tadmor, T., J. Bejar, D. Attias, E. Mischenko, E. Sabo, G. Neufeld and Z. Vadasz (2013). "The expression of lysyl-oxidase gene family members in myeloproliferative neoplasms." Am J Hematol **88**(5): 355-358.

Tan, K. S., K. Kulkeaw, Y. Nakanishi and D. Sugiyama (2017). "Expression of cytokine and extracellular matrix mRNAs in fetal hepatic stellate cells." Genes Cells **22**(9): 836-844.

Tan, X. and M. Chen (2014). "MYLK and MYL9 expression in non-small cell lung cancer identified by bioinformatics analysis of public expression data." Tumour Biol **35**(12): 12189-12200.

- Tang, Z., H. Cai, R. Wang and Y. Cui (2018). "Overexpression of CD300A inhibits progression of NSCLC through downregulating Wnt/ β -catenin pathway." OncoTargets and therapy **11**: 8875-8883.
- Tang, Z., Q. Shen, H. Xie, Z. Zhou, G. Shi, C. Zhang, A. Mohammed, Y. Wu, S. Ni and X. Zhou (2018). "Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) is a predictor of poor prognosis in non-small cell lung cancer, and its dynamic pattern following treatment with SGK1 inhibitor and gamma-ray irradiation was elucidated." Oncol Rep **39**(3): 1505-1515.
- Thomas, D. A., S. Brien, S. Faderl, J. Cortes, G. Borthakur, J. A. Burger, R. Garriss, W. G. Wierda, M. J. Keating and H. M. Kantarjian (2009). "Prognostic Significance of Beta-2 Microglobulin (B2M) in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL)." Blood **114**(22): 4679.
- Thompson, T. W., B. T. Jackson, P. J. Li, J. Wang, A. B. Kim, K. T. H. Huang, L. Zhang and D. H. Raulet (2018). "Tumor-derived CSF-1 induces the NKG2D ligand RAE-1delta on tumor-infiltrating macrophages." Elife **7**.
- Torigoe, H., H. Yamamoto, M. Sakaguchi, C. Youyi, K. Namba, H. Sato, K. Shien, J. Soh, K. Suzawa, S. Tomida, K. Tsukuda, S. Miyoshi and S. Toyooka (2018). "Tumor-suppressive effect of LRIG1, a negative regulator of ErbB, in non-small cell lung cancer harboring mutant EGFR." Carcinogenesis **39**(5): 719-727.
- Uribe, D. J., E. K. Mandell, A. Watson, J. D. Martinez, J. A. Leighton, S. Ghosh and C. V. Rothlin (2017). "The receptor tyrosine kinase AXL promotes migration and invasion in colorectal cancer." PLoS One **12**(7): e0179979.
- van de Donk, N. W., M. L. Janmaat, T. Mutis, J. J. Lammerts van Bueren, T. Ahmadi, A. K. Sasser, H. M. Lokhorst and P. W. Parren (2016). "Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond." Immunol Rev **270**(1): 95-112.

- Velloso, F. J., M. C. Sogayar and R. G. Correa (2018). "Expression and in vitro assessment of tumorigenicity for NOD1 and NOD2 receptors in breast cancer cell lines." BMC research notes **11**(1): 222-222.
- Veloso, A., K. S. Kirkconnell, B. Magnuson, B. Biewen, M. T. Paulsen, T. E. Wilson and M. Ljungman (2014). "Rate of elongation by RNA polymerase II is associated with specific gene features and epigenetic modifications." Genome research **24**(6): 896-905.
- Vlecken, D. H. and C. P. Bagowski (2009). "LIMK1 and LIMK2 are important for metastatic behavior and tumor cell-induced angiogenesis of pancreatic cancer cells." Zebrafish **6**(4): 433-439.
- Voigt, P., W. W. Tee and D. Reinberg (2013). "A double take on bivalent promoters." Genes Dev **27**(12): 1318-1338.
- Vrzalikova, K., M. Ibrahim, M. Vockerodt, T. Perry, S. Margielewska, L. Lupino, E. Nagy, E. Soilleux, D. Liebelt, R. Hollows, A. Last, G. Reynolds, M. Abdullah, H. Curley, M. Care, D. Krappmann, R. Tooze, J. Allegood, S. Spiegel, W. Wei, C. B. J. Woodman and P. G. Murray (2018). "S1PR1 drives a feedforward signalling loop to regulate BATF3 and the transcriptional programme of Hodgkin lymphoma cells." Leukemia **32**(1): 214-223.
- Wada, T., T. Takagi, Y. Yamaguchi, D. Watanabe and H. Handa (1998). "Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription *in vitro*." **17**(24): 7395-7403.
- Wan, H., J. Cai, F. Chen, J. Zhu, J. Zhong and H. Zhong (2017). "SOX12: a novel potential target for acute myeloid leukaemia." Br J Haematol **176**(3): 421-430.

- Wang, D., X. Qian, M. Rajaram, M. E. Durkin and D. R. Lowy (2016). "DLC1 is the principal biologically-relevant down-regulated DLC family member in several cancers." Oncotarget 7(29): 45144-45157.
- Wang, G., F. Bie, X. Qu, X. Yang, S. Liu, Y. Wang, C. Huang, K. Wang and J. Du (2018). "Expression profiling of ubiquitin-related genes in LKB1 mutant lung adenocarcinoma." Sci Rep 8(1): 13221.
- Wang, H., L. Hu, M. Zang, B. Zhang, Y. Duan, Z. Fan, J. Li, L. Su, M. Yan, Z. Zhu, B. Liu and Q. Yang (2016). "REG4 promotes peritoneal metastasis of gastric cancer through GPR37." Oncotarget 7(19): 27874-27888.
- Wang, J., L. Yang, F. Liang, Y. Chen and G. Yang (2018). Integrin alpha x stimulates cancer angiogenesis through PI3K/Akt signaling-mediated VEGFR2/VEGF-A overexpression in blood vessel endothelial cells: WANG et al.
- Wang, J. H., A. Nichogiannopoulou, L. Wu, L. Sun, A. H. Sharpe, M. Bigby and K. Georgopoulos (1996). "Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation." Immunity 5(6): 537-549.
- Wang, J. L., Z. Qi, Y. H. Li, H. M. Zhao, Y. G. Chen and W. Fu (2017). "TGFbeta induced factor homeobox 1 promotes colorectal cancer development through activating Wnt/beta-catenin signaling." Oncotarget 8(41): 70214-70225.
- Wang, L.-L., H.-H. Guo, Y. Zhan, C.-L. Feng, S. Huang, Y.-X. Han, W.-S. Zheng and J.-D. Jiang (2017). "Specific up-regulation of p21 by a small active RNA sequence suppresses human colorectal cancer growth." Oncotarget 8(15): 25055-25065.

Wang, L., A. Howarth and R. E. Clark (2014). "Ikaros transcripts Ik6/10 and levels of full-length transcript are critical for chronic myeloid leukaemia blast crisis transformation." Leukemia **28**: 1745.

Wang, L., G. Song, X. Zhang, T. Feng, J. Pan, W. Chen, M. Yang, X. Bai, Y. Pang, J. Yu, J. Han and B. Han (2017). "PADI2-Mediated Citrullination Promotes Prostate Cancer Progression." Cancer Res **77**(21): 5755-5768.

Wang, X., Q. Hou and X. Zhou (2018). "LAMA4 expression is activated by zinc finger Eboxbinding homeobox 1 and independently predicts poor overall survival in gastric cancer." Oncol Rep **40**(3): 1725-1733.

Wang, Y., D. He, L. Yang, B. Wen, J. Dai, Q. Zhang, J. Kang, W. He, Q. Ding and D. He (2015). "TRIM26 functions as a novel tumor suppressor of hepatocellular carcinoma and its downregulation contributes to worse prognosis." Biochem Biophys Res Commun **463**(3): 458-465.

Wang, Y., T. Pan, L. Li, H. Wang, J. Li, D. Zhang and H. Yang (2017). "Knockdown of TGIF attenuates the proliferation and tumorigenicity of EC109 cells and promotes cisplatin-induced apoptosis." Oncology letters **14**(6): 6519-6524.

Wang, Z., Z. Liu, X. Wu, S. Chu, J. Wang, H. Yuan, M. Roth, Y. C. Yuan, R. Bhatia and W. Chen (2014). "ATRA-induced cellular differentiation and CD38 expression inhibits acquisition of BCR-ABL mutations for CML acquired resistance." PLoS Genet **10**(6): e1004414.

Wei, J.-C., J. Yang, D. Liu, M.-F. Wu, L. Qiao, J.-N. Wang, Q.-F. Ma, Z. Zeng, S.-M. Ye, E.-S. Guo, X.-F. Jiang, L.-Y. You, Y. Chen, L. Zhou, X.-Y. Huang, T. Zhu, L. Meng, J.-F. Zhou, Z.-H. Feng, D. Ma and Q.-L. Gao (2017). "Tumor-associated Lymphatic Endothelial Cells

Promote Lymphatic Metastasis By Highly Expressing and Secreting SEMA4C." Clinical Cancer Research **23**(1): 214.

Weichand, B., R. Popp, S. Dziumbila, J. Mora, E. Strack, E. Elwakeel, A. C. Frank, K. Scholich, S. Pierre, S. N. Syed, C. Olesch, J. Ringleb, B. Oren, C. Doring, R. Savai, M. Jung, A. von Knethen, B. Levkau, I. Fleming, A. Weigert and B. Brune (2017). "S1PR1 on tumor-associated macrophages promotes lymphangiogenesis and metastasis via NLRP3/IL-1beta." J Exp Med **214**(9): 2695-2713.

Weiss, M. J., C. Yu and S. H. Orkin (1997). "Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line." Mol Cell Biol **17**(3): 1642-1651.

Weng, A. P., A. A. Ferrando, W. Lee, J. P. t. Morris, L. B. Silverman, C. Sanchez-Irizarry, S. C. Blacklow, A. T. Look and J. C. Aster (2004). "Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia." Science **306**(5694): 269-271.

Wenzl, K., K. Troppan, P. Neumeister and A. J. Deutsch (2015). "The nuclear orphan receptor NR4A1 and NR4A3 as tumor suppressors in hematologic neoplasms." Curr Drug Targets **16**(1): 38-46.

Whitman, S. P., J. Kohlschmidt, K. Maharry, S. Volinia, K. Mrozek, D. Nicolet, S. Schwind, H. Becker, K. H. Metzeler, J. H. Mendler, A. K. Eisfeld, A. J. Carroll, B. L. Powell, T. H. Carter, M. R. Baer, J. E. Kolitz, I. K. Park, R. M. Stone, M. A. Caligiuri, G. Marcucci and C. D. Bloomfield (2014). "GAS6 expression identifies high-risk adult AML patients: potential implications for therapy." Leukemia **28**(6): 1252-1258.

Willer, A., J. S. Jakobsen, E. Ohlsson, N. Rapin, J. Waage, M. Billing, L. Bullinger, S. Karlsson and B. T. Porse (2015). "TGIF1 is a negative regulator of MLL-rearranged acute myeloid leukemia." Leukemia **29**(5): 1018-1031.

Williams, K. A., M. Lee, Y. Hu, J. Andreas, S. J. Patel, S. Zhang, P. Chines, A. Elkahloun, S. Chandrasekharappa, J. S. Gutkind, A. A. Molinolo and N. P. S. Crawford (2014). "A systems genetics approach identifies CXCL14, ITGAX, and LPCAT2 as novel aggressive prostate cancer susceptibility genes." PLoS genetics **10**(11): e1004809-e1004809.

Winandy, S., P. Wu and K. Georgopoulos (1995). "A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma." Cell **83**(2): 289-299.

Wragg, J. W., J. P. Finnity, J. A. Anderson, H. J. M. Ferguson, E. Porfiri, R. I. Bhatt, P. G. Murray, V. L. Heath and R. Bicknell (2016). "MCAM and LAMA4 Are Highly Enriched in Tumor Blood Vessels of Renal Cell Carcinoma and Predict Patient Outcome." Cancer research **76**(8): 2314-2326.

Wu, G., Z. Ma, W. Hu, D. Wang, B. Gong, C. Fan, S. Jiang, T. Li, J. Gao and Y. Yang (2017). "Molecular insights of Gas6/TAM in cancer development and therapy." Cell Death & Disease **8**: e2700.

Wu, H.-T., C.-R. Xie, J. Lv, H.-Q. Qi, F. Wang, S. Zhang, Q.-L. Fang, F.-Q. Wang, Y.-Y. Lu and Z.-Y. Yin (2018). "The tumor suppressor DLC1 inhibits cancer progression and oncogenic autophagy in hepatocellular carcinoma." Laboratory Investigation **98**(8): 1014-1024.

Wu, H., J. Bi, Y. Peng, L. Huo, X. Yu, Z. Yang, Y. Zhou, L. Qin, Y. Xu, L. Liao, Y. Xie, O. M. Conneely, J. Jonkers and J. Xu (2017). "Nuclear receptor NR4A1 is a tumor suppressor down-regulated in triple-negative breast cancer." Oncotarget **8**(33): 54364-54377.

- Wu, N., T. Kurosu, G. Oshikawa, T. Nagao and O. Miura (2013). "PECAM-1 is involved in BCR/ABL signaling and may downregulate imatinib-induced apoptosis of Philadelphia chromosome-positive leukemia cells." Int J Oncol **42**(2): 419-428.
- Wu, Q., X. Ren, Y. Zhang, X. Fu, Y. Li, Y. Peng, Q. Xiao, T. Li, C. Ouyang, Y. Hu, Y. Zhang, W. Zhou, W. Yan, K. Guo, W. Li, Y. Hu, X. Yang, G. Shu, H. Xue, Z. Wei, Y. Luo and G. Yin (2018). "MiR-221-3p targets ARF4 and inhibits the proliferation and migration of epithelial ovarian cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **497**(4): 1162-1170.
- Wu, X., P. Tao, Q. Zhou, J. Li, Z. Yu, X. Wang, J. Li, C. Li, M. Yan, Z. Zhu, B. Liu and L. Su (2017). "IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway." Oncotarget **8**(13): 20741-20750.
- Xiang, G., Y. Yi, H. Weiwei and W. Weiming (2015). "TGIF1 promoted the growth and migration of cancer cells in nonsmall cell lung cancer." Tumour Biol **36**(12): 9303-9310.
- Xu, T., W. Jiang, L. Fan, Q. Gao and G. Li (2017). "Upregulation of long noncoding RNA Xist promotes proliferation of osteosarcoma by epigenetic silencing of P21." Oncotarget **8**(60): 101406-101417.
- Xu, W., J. Y. Li, Y. J. Wu, H. Yu, Q. D. Shen, T. Tian, L. Li and H. X. Qiu (2009). "CD38 as a prognostic factor in Chinese patients with chronic lymphocytic leukaemia." Leuk Res **33**(2): 237-243.
- Xu, X., B. Wang and Y. Xu (2013). "Expression of lysyl oxidase in human osteosarcoma and its clinical significance: a tumor suppressive role of LOX in human osteosarcoma cells." Int J Oncol **43**(5): 1578-1586.

- Xu, X. Q., C. M. Huang, Y. F. Zhang, L. Chen, H. Cheng and J. M. Wang (2016). "S1PR1 mediates antiapoptotic/proproliferative processes in human acute myeloid leukemia cells." Mol Med Rep **14**(4): 3369-3375.
- Yamato, G., H. Yamaguchi, H. Handa, N. Shiba, M. Kawamura, S. Wakita, K. Inokuchi, Y. Hara, K. Ohki, J. Okubo, M.-J. Park, M. Sotomatsu, H. Arakawa and Y. Hayashi (2017). "Clinical features and prognostic impact of PRDM16 expression in adult acute myeloid leukemia." **56**(11): 800-809.
- Yamawaki, K., T. Ishiguro, Y. Mori, K. Yoshihara, K. Suda, R. Tamura, M. Yamaguchi, M. Sekine, K. Kashima, M. Higuchi, M. Fujii, K. Okamoto and T. Enomoto (2017). "Sox2-dependent inhibition of p21 is associated with poor prognosis of endometrial cancer." Cancer Sci **108**(4): 632-640.
- Yan, H., F. Xiao, J. Zou, C. Qiu, W. Sun, M. Gu and L. Zhang (2017). "NR4A1-induced increase in the sensitivity of a human gastric cancer line to TNF α -mediated apoptosis is associated with the inhibition of JNK/Parkin-dependent mitophagy." International journal of oncology **52**(2): 367-378.
- Yan, T., Z. Lin, J. Jiang, S. Lu, M. Chen, H. Que, X. He, G. Que, J. Mao, J. Xiao and Q. Zheng (2015). "MMP14 regulates cell migration and invasion through epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma." American journal of translational research **7**(5): 950-958.
- Yang, W., X. Lan, D. Li, T. Li and S. Lu (2015). "MiR-223 targeting MAFB suppresses proliferation and migration of nasopharyngeal carcinoma cells." BMC cancer **15**: 461-461.

Yang, Z. X., B. Zhang, J. Wei, G. Q. Jiang, Y. L. Wu, B. J. Leng and C. G. Xing (2018). "MiR-539 inhibits proliferation and migration of triple-negative breast cancer cells by down-regulating LAMA4 expression." Cancer Cell Int **18**: 16.

Yatim, A., C. Benne, B. Sobhian, S. Laurent-Chabalier, O. Deas, J. G. Judde, J. D. Lelievre, Y. Levy and M. Benkirane (2012). "NOTCH1 nuclear interactome reveals key regulators of its transcriptional activity and oncogenic function." Mol Cell **48**(3): 445-458.

Yi, J., D. Huang, X. Li, G. Jiang, J. Dong and Y. Liu (2016). TRIM26 acts as a tumor suppressor in non-small-cell lung cancer.

Ying, Z., M. Sandoval and S. Beronja (2018). "Oncogenic activation of PI3K induces progenitor cell differentiation to suppress epidermal growth." Nat Cell Biol **20**(11): 1256-1266.

Yoshida, T., I. Hazan, J. Zhang, S. Y. Ng, T. Naito, H. J. Snippert, E. J. Heller, X. Qi, L. N. Lawton, C. J. Williams and K. Georgopoulos (2008). "The role of the chromatin remodeler Mi-2beta in hematopoietic stem cell self-renewal and multilineage differentiation." Genes Dev **22**(9): 1174-1189.

Yoshida, T., S. Y. Ng and K. Georgopoulos (2010). "Awakening lineage potential by Ikaros-mediated transcriptional priming." Curr Opin Immunol **22**(2): 154-160.

You, T., W. Gao, J. Wei, X. Jin, Z. Zhao, C. Wang and Y. Li (2015). "Overexpression of LIMK1 promotes tumor growth and metastasis in gastric cancer." Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie **69**: 96-101.

Yu, S.-T., Q. Zhong, R.-H. Chen, P. Han, S.-B. Li, H. Zhang, L. Yuan, T.-L. Xia, M.-S. Zeng and X.-M. Huang (2018). "CRLF1 promotes malignant phenotypes of papillary thyroid

carcinoma by activating the MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways." Cell death & disease **9**(3): 371-371.

Yuan, P., L. Meng and N. Wang (2017). "SOX12 upregulation is associated with metastasis of hepatocellular carcinoma and increases CDK4 and IGF2BP1 expression." Eur Rev Med Pharmacol Sci **21**(17): 3821-3826.

Zekavati, A., A. Nasir, A. Alcaraz, M. Aldrovandi, P. Marsh, J. D. Norton and J. J. Murphy (2014). "Post-transcriptional regulation of BCL2 mRNA by the RNA-binding protein ZFP36L1 in malignant B cells." PLoS One **9**(7): e102625.

Zeng, Z.-l., W.-j. Wu, J. Yang, Z.-j. Tang, D.-l. Chen, M.-z. Qiu, H.-y. Luo, Z.-q. Wang, Y. Jin, D.-s. Wang and R.-h. Xu (2012). "Prognostic relevance of melanoma antigen D1 expression in colorectal carcinoma." Journal of translational medicine **10**: 181-181.

Zhang, G., M. Wang, H. Zhao and W. Cui (2018). "Function of Axl receptor tyrosine kinase in non-small cell lung cancer." Oncol Lett **15**(3): 2726-2734.

Zhang, J., A. F. Jackson, T. Naito, M. Dose, J. Seavitt, F. Liu, E. J. Heller, M. Kashiwagi, T. Yoshida, F. Gounari, H. T. Petrie and K. Georgopoulos (2011). "Harnessing of the nucleosome-remodeling-deacetylase complex controls lymphocyte development and prevents leukemogenesis." Nat Immunol **13**(1): 86-94.

Zhang, M. Z., O. Ferrigno, Z. Wang, M. Ohnishi, C. Prunier, L. Levy, M. Razzaque, W. C. Horne, D. Romero, G. Tzivion, F. Colland, R. Baron and A. Atfi (2015). "TGIF governs a feed-forward network that empowers Wnt signaling to drive mammary tumorigenesis." Cancer Cell **27**(4): 547-560.

- Zhang, Q., K. Shim, K. Wright, A. Jurkevich and S. Khare (2016). "Atypical role of sprouty in p21 dependent inhibition of cell proliferation in colorectal cancer." Mol Carcinog **55**(9): 1355-1368.
- Zhang, X., W. Ma, J. Cui, H. Yao, H. Zhou, Y. Ge, L. Xiao, X. Hu, B. H. Liu, J. Yang, Y. Y. Li, S. Chen, C. J. Eaves, D. Wu and Y. Zhao (2015). "Regulation of p21 by TWIST2 contributes to its tumor-suppressor function in human acute myeloid leukemia." Oncogene **34**(23): 3000-3010.
- Zhang, Y., A. Li, J. Shi, Y. Fang, C. Gu, J. Cai, C. Lin, L. Zhao and S. Liu (2018). "Imbalanced LIMK1 and LIMK2 expression leads to human colorectal cancer progression and metastasis via promoting β -catenin nuclear translocation." Cell Death & Disease **9**(7): 749.
- Zhao, B., Y. Mei, J. Yang and P. Ji (2014). "Mouse fetal liver culture system to dissect target gene functions at the early and late stages of terminal erythropoiesis." Journal of visualized experiments : JoVE(91): e51894-e51894.
- Zhao, Y., H. Yu and W. Hu (2014). "The regulation of MDM2 oncogene and its impact on human cancers." Acta biochimica et biophysica Sinica **46**(3): 180-189.
- Zheng, Y., X. Wang, H. Wang, W. Yan, Q. Zhang and X. Chang (2014). "Expression of the lysyl oxidase propeptide in hepatocellular carcinoma and its clinical relevance." Oncol Rep **31**(4): 1669-1676.
- Zhong, M., M. L. Boseman, A. C. Millena and S. A. Khan (2010). "Oxytocin induces the migration of prostate cancer cells: involvement of the Gi-coupled signaling pathway." Molecular cancer research : MCR **8**(8): 1164-1172.

- Zhou, B., J. Wang, S. Y. Lee, J. Xiong, N. Bhanu, Q. Guo, P. Ma, Y. Sun, R. C. Rao, B. A. Garcia, J. L. Hess and Y. Dou (2016). "PRDM16 Suppresses MLL1r Leukemia via Intrinsic Histone Methyltransferase Activity." Molecular cell **62**(2): 222-236.
- Zhou, Q., T. Li and D. H. Price (2012). "RNA polymerase II elongation control." Annu Rev Biochem **81**: 119-143.
- Zhu, B., J.-R. Yang, Y. Jia, P. Zhang, L. Shen, X.-L. Li, J. Li and B. Wang (2017). "Overexpression of NR4A1 is associated with tumor recurrence and poor survival in non-small-cell lung carcinoma." Oncotarget **8**(69): 113977-113986.
- Zhu, P., Y. Wang, Y. Du, L. He, G. Huang, G. Zhang, X. Yan and Z. Fan (2015). "C8orf4 negatively regulates self-renewal of liver cancer stem cells via suppression of NOTCH2 signalling." Nat Commun **6**: 7122.
- Zhu, S., Y. Xu, M. Song, G. Chen, H. Wang, Y. Zhao, Z. Wang and F. Li (2016). "PRDM16 is associated with evasion of apoptosis by prostatic cancer cells according to RNA interference screening." Mol Med Rep **14**(4): 3357-3361.
- Zou, M., X. Zhang and C. Xu (2016). "IL6-induced metastasis modulators p-STAT3, MMP-2 and MMP-9 are targets of 3,3'-diindolylmethane in ovarian cancer cells." Cell Oncol (Dordr) **39**(1): 47-57.
- Zudaire, E., A. Martinez and F. Cuttitta (2003). "Adrenomedullin and cancer." Regul Pept **112**(1-3): 175-183.

FIGURES

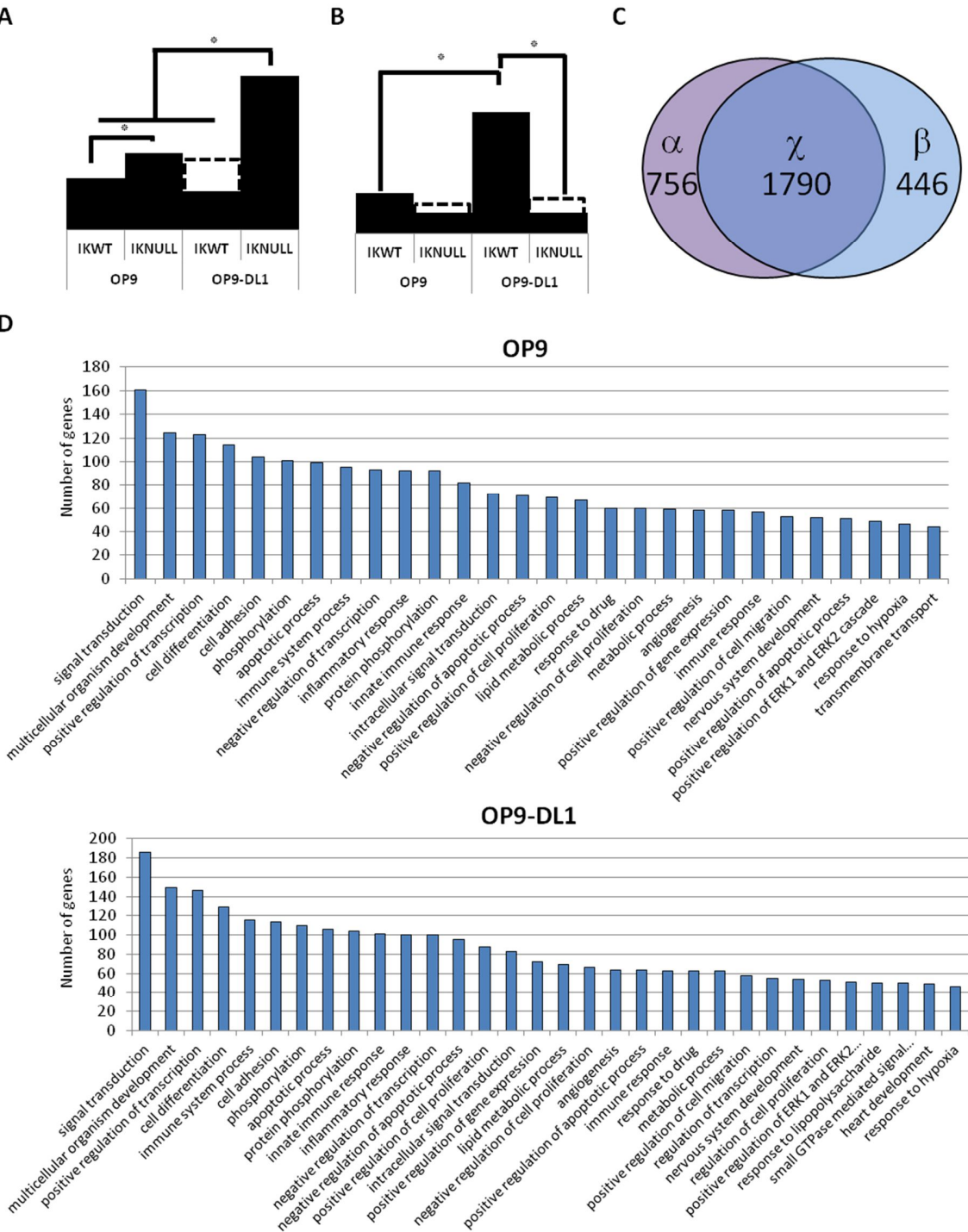


Figure 1. RNA-sequencing analysis of Ter119+ EryC Ik^{Null} and Ik^{WT} upon NOTCH pathway activation.

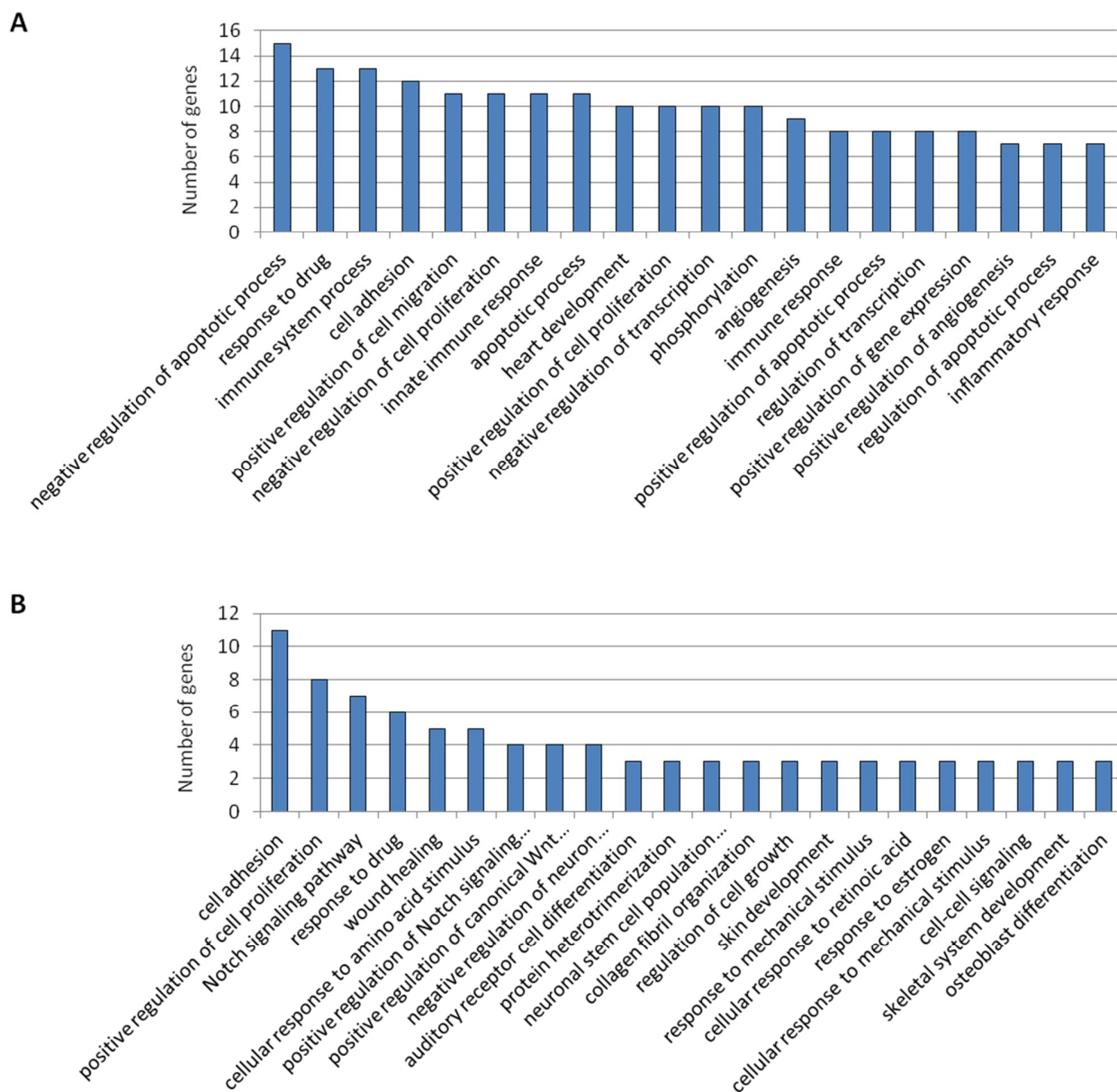


Figure 2. IKAROS mutation promotes the deregulation of several functional groups of genes upon NOTCH activation.

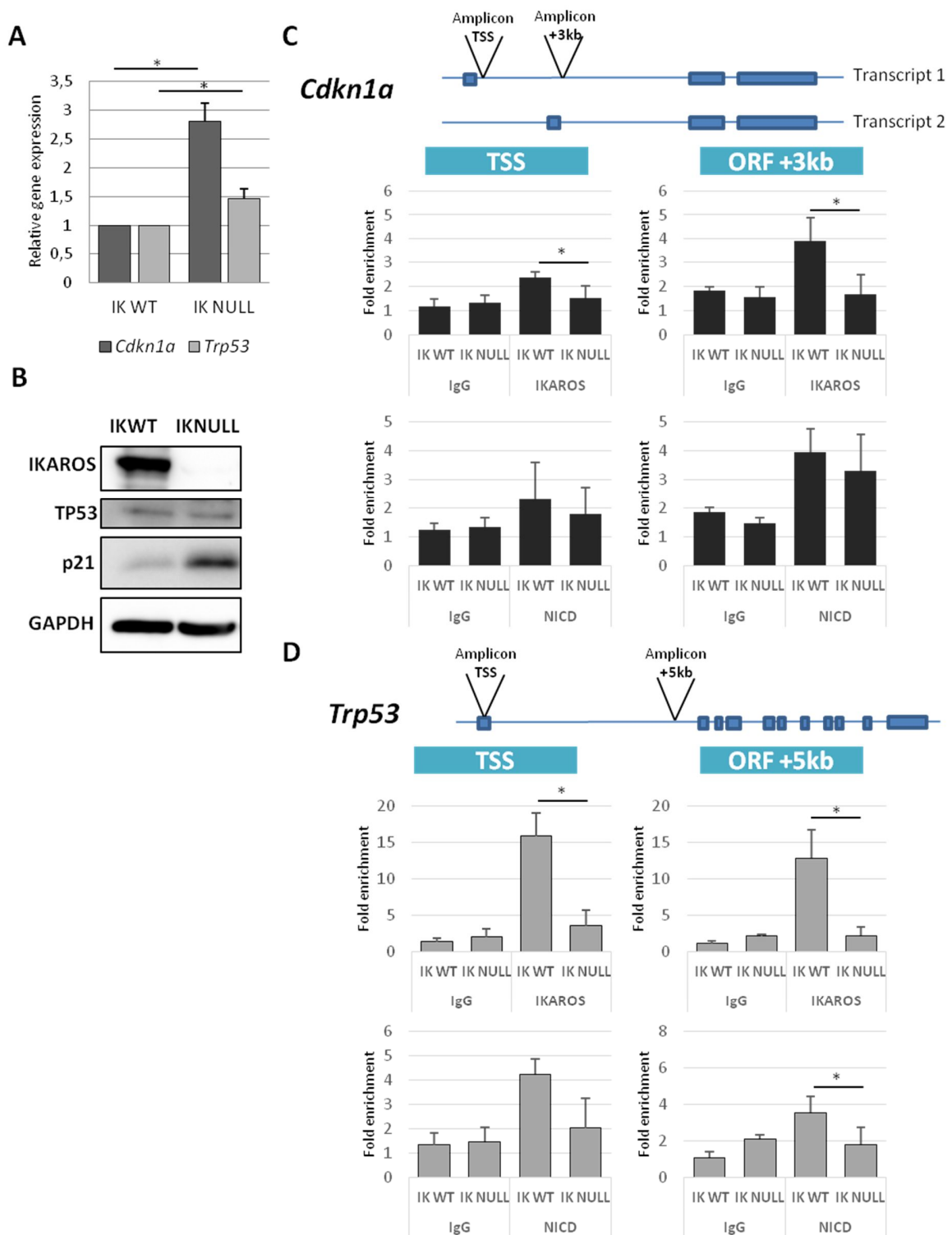


Figure 3. Characterization of *Cdkn1a* and *Trp53* genes in *Ik^{Null}* and *Ik^{WT}* mouse fetal liver EryC.

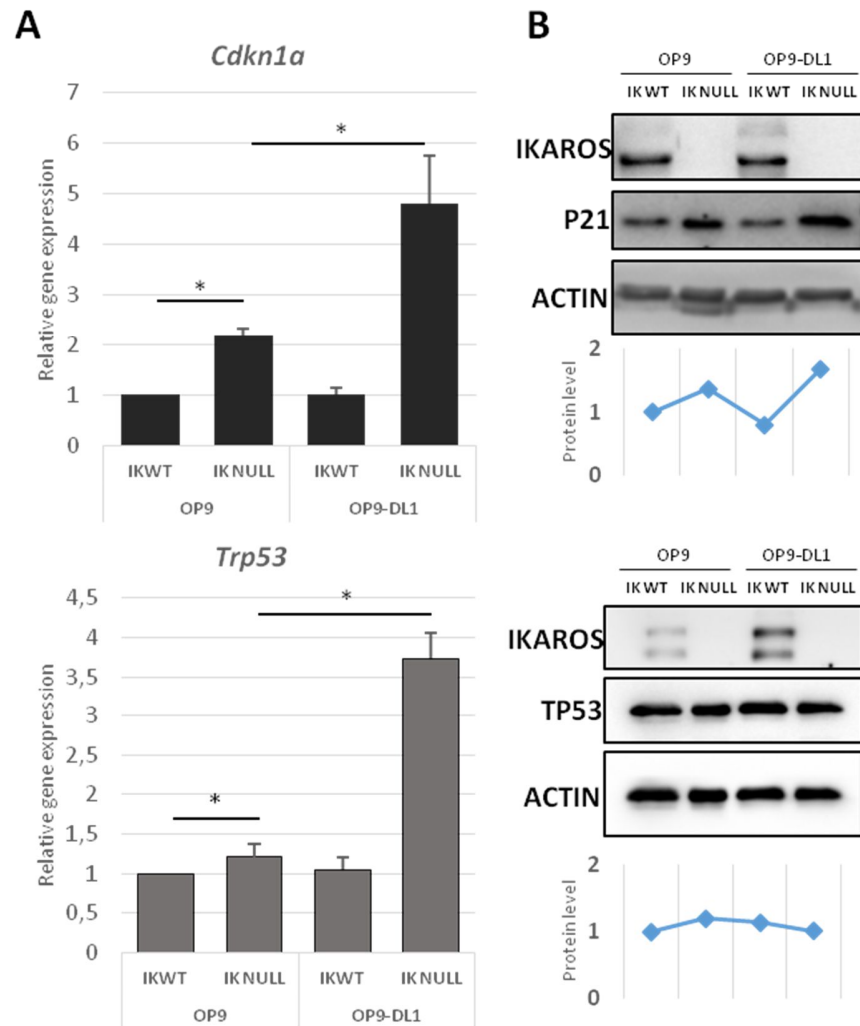


Figure 4. *Cdkn1a* and *Trp53* gene and protein expression in Ik^{Null} and Ik^{WT} mouse fetal liver EryC upon activation of the NOTCH pathway.

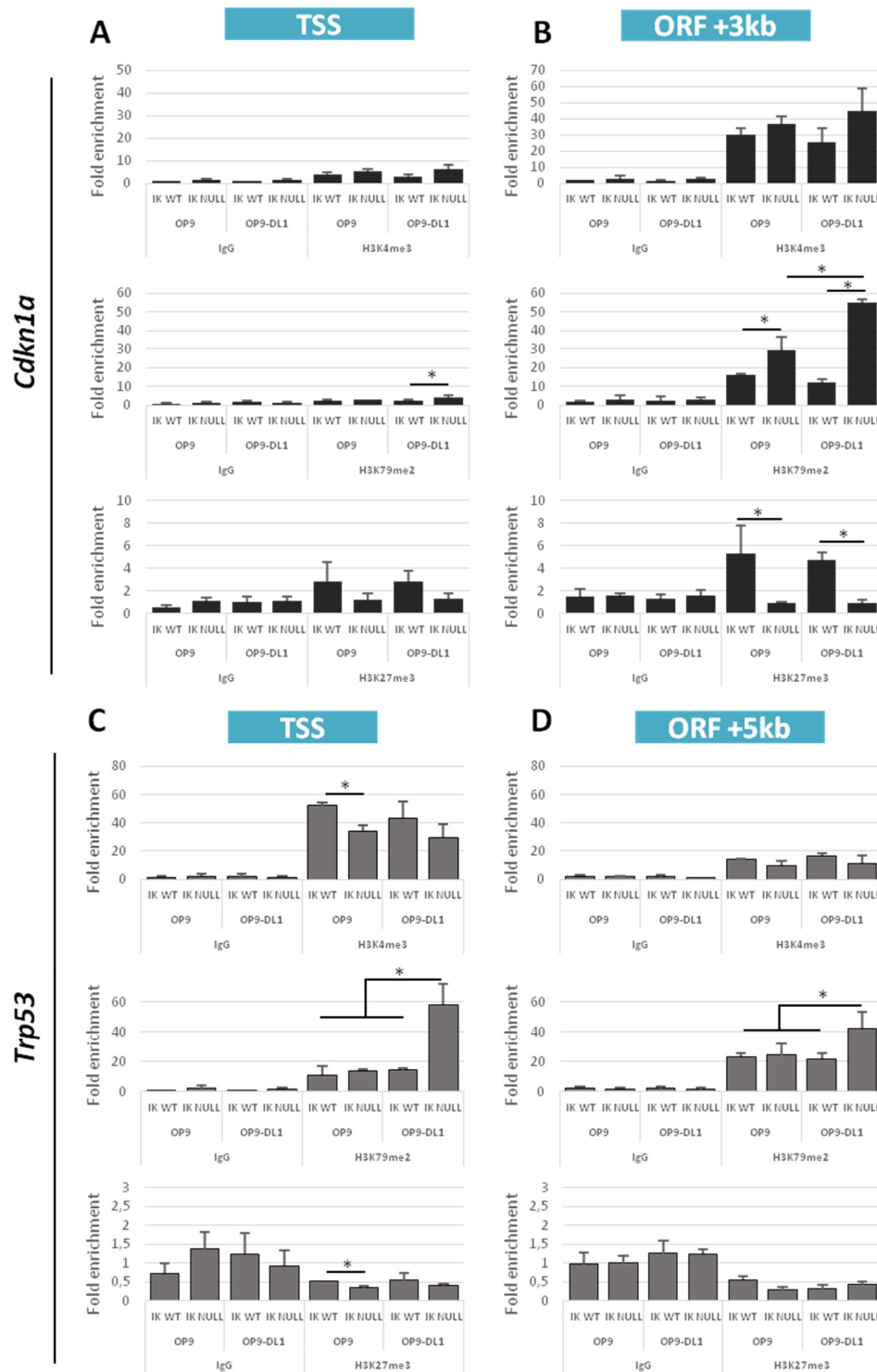


Figure 5. Enrichment of histone post-translational modifications related to transcription activation and elongation at *Cdkn1a* and *Trp53* genes in *Ik*^{Null} and *Ik*^{WT} mouse fetal liver EryC co-cultured with OP9 or OP9-DL1 cells.

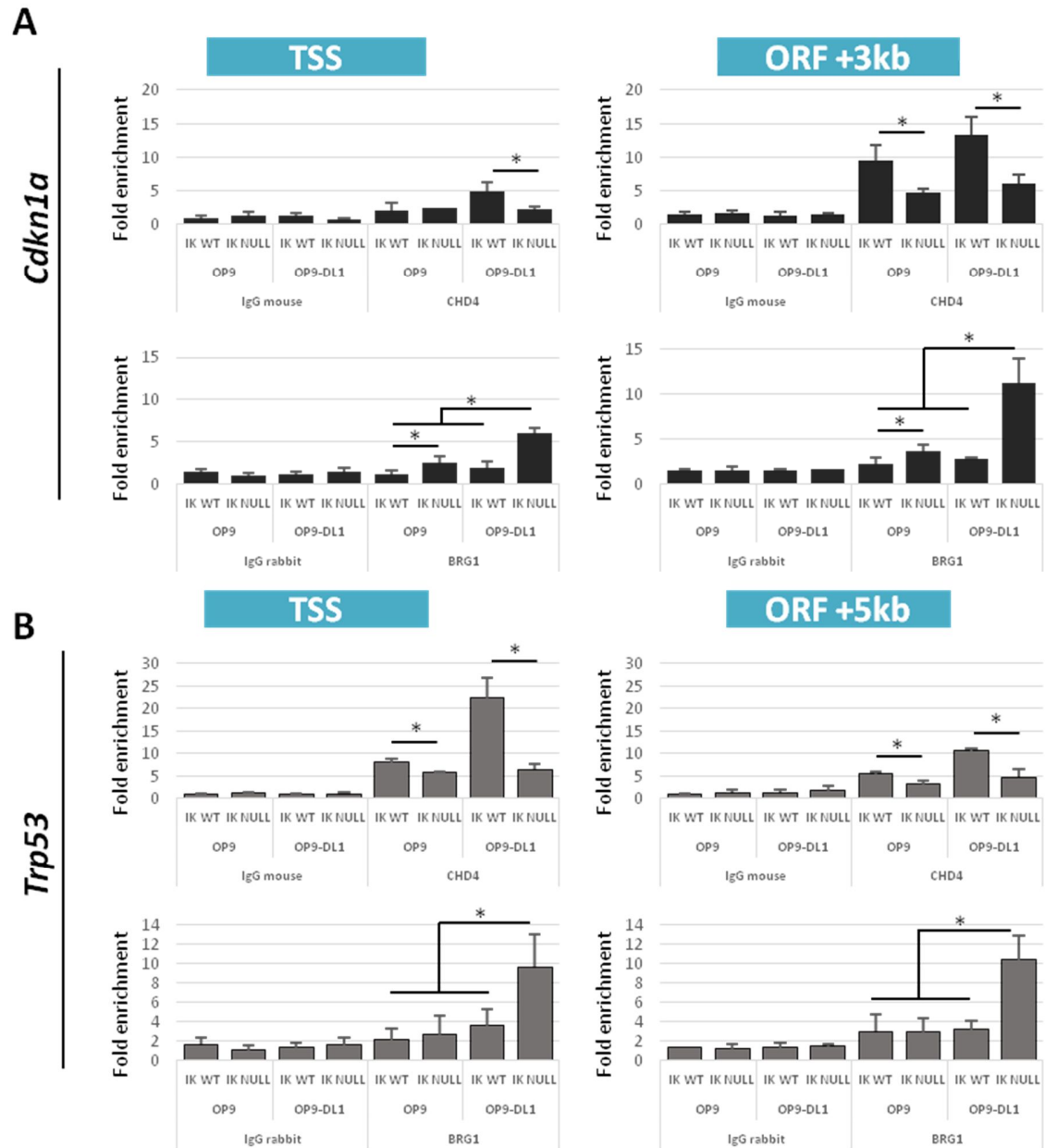


Figure 6. BRG1 and CHD4 enrichments to *Cdkn1a* and *Trp53* genes in Ik^{Null} and Ik^{WT} mouse fetal liver EryC co-cultured on OP9 or OP9-DL1 cells.

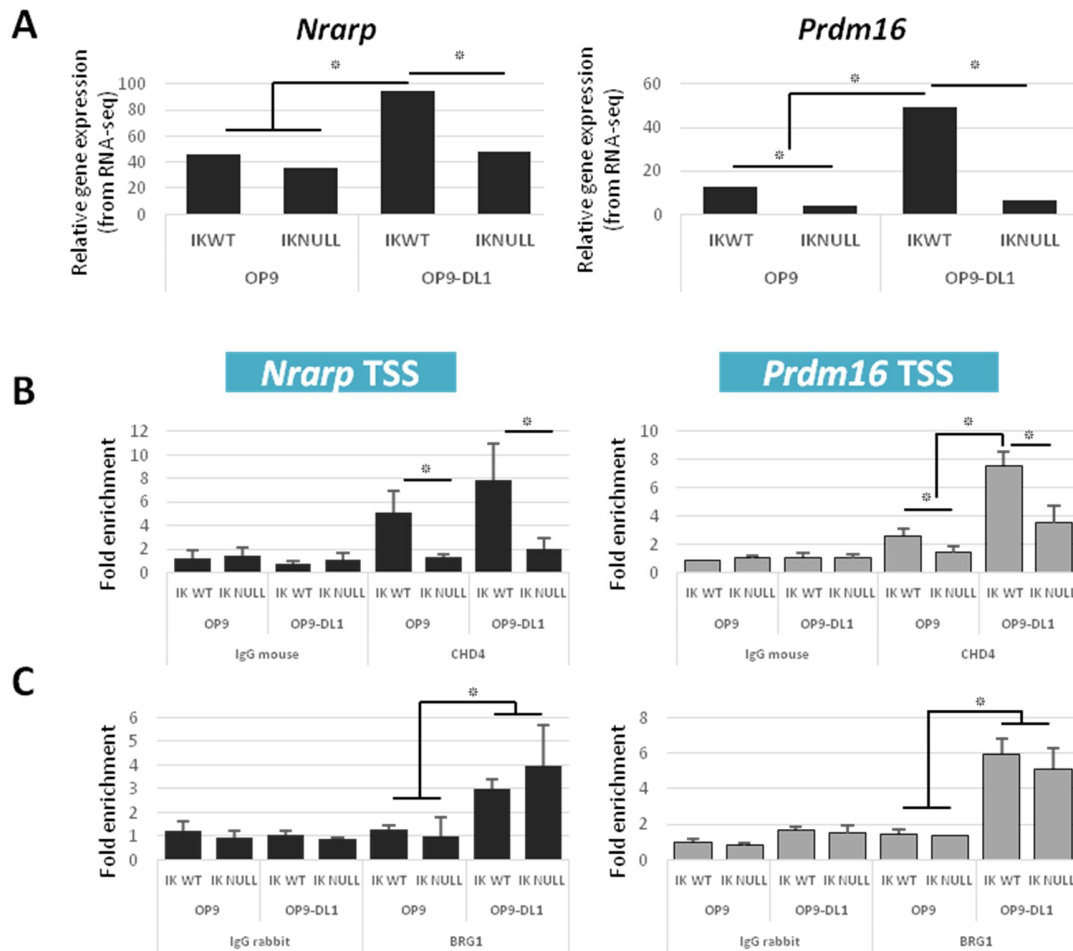


Figure 7. Characterization of *Nrarp* and *Prdm16* genes in *Ik*^{Null} and *Ik*^{WT} mouse fetal liver EryC co-cultured with OP9 or OP9-DL1 cells.

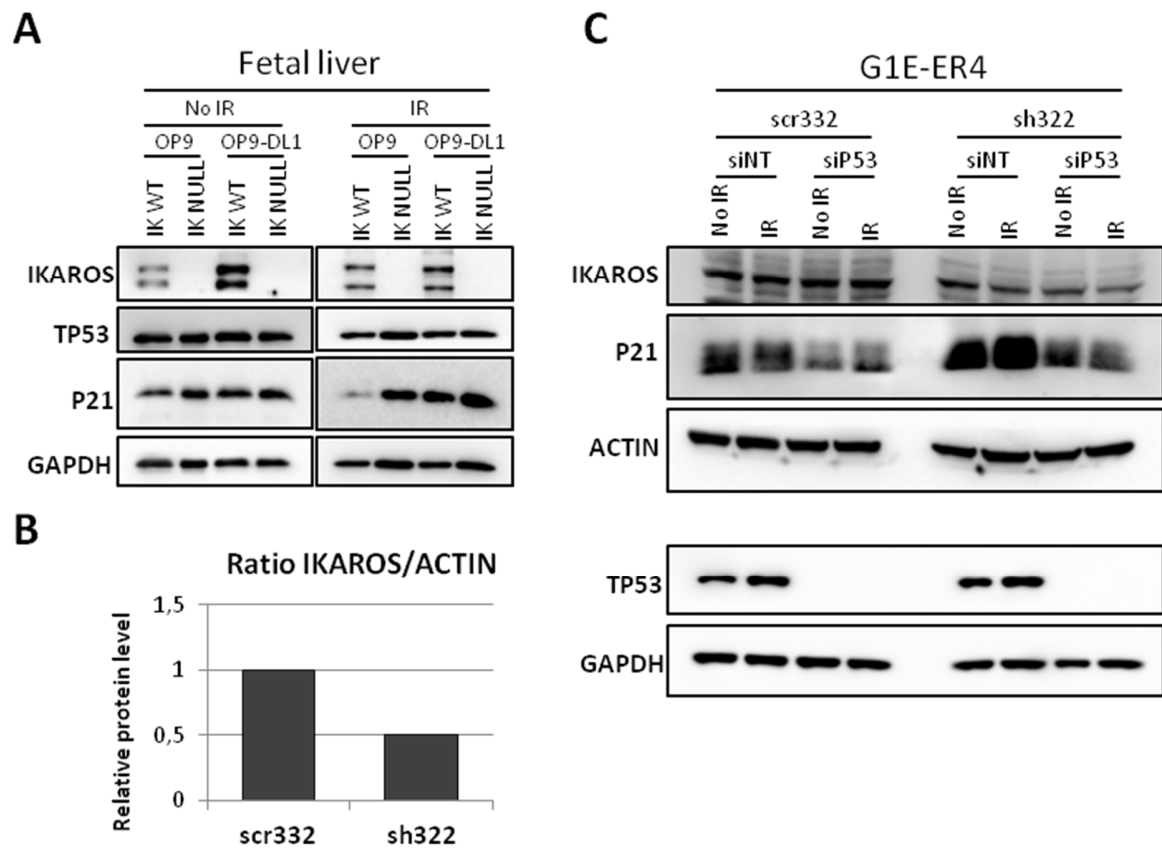


Figure 8. Determination of the influence of IKAROS on TP53 and P21^{WAF1/CIP1} expression when the cells are exposed to ionizing radiation.

SUPPLEMENTARY TABLES AND FIGURES

Table S1. Oligonucleotides used for RT-qPCR analysis

| Gene | Primer Forward (5') | Primer Reverse (3') |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Cdkn1a</i> TSS | ATTACGTGCAATGGTGTGC | AACTTCTGGCTTCCCAGAGC |
| <i>Cdkn1a</i> +3kb | TAGAGCTTAGCGCAGAGCGG | GCACTTGGTTCACAAGGACC |
| <i>Trp53</i> TSS | CGACTACAGTTAGGGGGGCAC | AGAGGTCTCGTCACGCTCAT |
| <i>Trp53</i> +5kb | GAGATTGGCTGGCTGTGACT | TCCCTAGGCTATGAGGTAGGC |
| <i>Prdm16</i> TSS | GCGAAAAGTTGACGAAAGGGG | GCCCACTATTTCAAAAGCCCG |
| <i>Nrarp</i> TSS | CTAGCTCTGCGGCAACATGA | CGTCGATGACTGACTGGTGT |
| <i>Thp.1</i> (<i>Uromodulin</i>) | GGTGGATGGTGTGGTCACAAC | GGTCTTGACACACCAGCTTT |

Table S2. Oligonucleotides used for ChIP analysis

| Gene | Primer Forward (5') | Primer Reverse (3') |
|---------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Cdkn1a</i> | TGTCTTGCACTCTGGTGTCTG | ATCTGCGCTTGGAGTGATAGA |
| <i>Trp53</i> | ACGTGCTCACCTGGCTAAA | GACACCCTGCTGGGAAGGAG |
| <i>Cdkn2a</i> | GGGCACTGCTGGAAGCC | AACGTTGCCCATCATCATC |
| <i>Hprt</i> | CACAGGACTAGAACACCTGC | GCTGGTGAAAAGGACCTC |
| <i>Il6</i> | TGGAGTCACAGAAGGAGTGGC | AACGCACTAGGTTTGCCGAG |
| <i>Zfp446</i> | AGGAGGCCGCAGTTCTTGTT | GGACTCCGTTGCTGCTGAGA |

Table S3. Overexpressed genes in IK^{WT} Ter119+/OP9-DL1 compared to OP9 with a log2>0.8 and FDR<0.05

| Gene ID | Mean Ik ^{WT} - OP9/DL1 | Mean Ik ^{WT} - OP9 | log2FoldChange | p-value |
|---------|------------------------------------|--------------------------------|----------------|------------|
| Dll1 | 374,409654 | 2,4955434 | 5,12548337 | 6,5781E-41 |
| Col15a1 | 49,2931872 | 6,11287759 | 2,13331756 | 1,9748E-07 |
| Cav1 | 99,2316208 | 34,4244982 | 1,3485142 | 1,0121E-06 |
| Fbn1 | 96,669504 | 22,8031183 | 1,60322398 | 5,6896E-06 |
| Spic | 54,6004498 | 13,7754631 | 1,72092092 | 1,0538E-05 |
| Gzma | 5,96295911 | 0 | 2,20612762 | 1,1803E-05 |
| Cd248 | 25,8382656 | 4,29551122 | 1,80412032 | 1,659E-05 |
| Timd4 | 15,7527483 | 1,14563451 | 2,03425605 | 1,7441E-05 |
| Col5a3 | 32,868579 | 3,24107695 | 1,89351554 | 2,2942E-05 |
| Col3a1 | 151,385148 | 35,3655904 | 1,53357536 | 6,6842E-05 |
| Itga9 | 40,4060238 | 9,77592941 | 1,49324521 | 6,6977E-05 |
| Lrig1 | 302,696028 | 120,504426 | 1,26435942 | 0,00013759 |
| Nrarp | 94,972046 | 45,9238531 | 1,00466295 | 0,00014579 |
| Pdgfrb | 60,2114676 | 11,5231987 | 1,59160697 | 0,00014637 |
| Emr4 | 22,9281237 | 3,89317257 | 1,63020646 | 0,00016089 |
| Mcpt1 | 66,8600995 | 1,34990889 | 1,7125855 | 0,00016759 |
| Colla1 | 212,509144 | 83,1446155 | 1,14318965 | 0,00017221 |
| Aqp1 | 6599,5668 | 2760,00252 | 1,13852392 | 0,00019064 |
| Rtn1 | 5,19379225 | 0,41302414 | 1,8978292 | 0,00020869 |
| Prdm16 | 49,4958878 | 12,747881 | 1,6530614 | 0,00023828 |

| | | | | |
|---------|------------|------------|------------|------------|
| Gzmb | 35,8065236 | 9,47100113 | 1,64289005 | 0,00024902 |
| Rph3al | 381,126067 | 174,121345 | 1,05113146 | 0,00035962 |
| Mcpt2 | 19,6800847 | 1,5760572 | 1,51520148 | 0,00049571 |
| Padi2 | 356,601025 | 113,190666 | 1,47087647 | 0,0004964 |
| Naalad2 | 5,31916952 | 0 | 1,73919665 | 0,00051657 |
| Abcg3 | 72,5177376 | 17,2968538 | 1,49533374 | 0,00067467 |
| Paqr6 | 330,220748 | 111,164249 | 1,2494097 | 0,00068274 |
| Col18a1 | 196,442193 | 76,9651522 | 1,11979502 | 0,00075013 |
| Cxcl5 | 74,2617979 | 10,1126463 | 1,52115691 | 0,00091317 |
| Rasgrp1 | 18,4715301 | 5,37802954 | 1,30130576 | 0,00095563 |
| Bank1 | 15,7207982 | 3,59322258 | 1,50259607 | 0,00099099 |
| Adamts2 | 8,34034056 | 0,82604828 | 1,48080601 | 0,00124941 |
| Wisp2 | 49,7841916 | 7,03236379 | 1,51013464 | 0,00154178 |
| Rspo2 | 6,98077957 | 0,95204562 | 1,54101545 | 0,00164776 |
| Hes1 | 34,725429 | 10,7605344 | 1,26884951 | 0,00169301 |
| Col6a1 | 427,854573 | 162,851524 | 1,13060137 | 0,00183668 |
| Col5a2 | 131,12385 | 50,2822455 | 1,10694299 | 0,00212313 |
| Atoh8 | 23,7506678 | 10,2125622 | 1,04432404 | 0,00215699 |
| Vill | 22,4887359 | 9,07364078 | 1,10189258 | 0,00238284 |
| Adam12 | 9,96225912 | 2,52810281 | 1,28230408 | 0,00280925 |
| Ccl28 | 3,42471079 | 0 | 1,48330708 | 0,00328461 |
| Scara5 | 2,74897112 | 0 | 1,46108161 | 0,00378887 |
| Cdh11 | 30,1888083 | 11,0644569 | 1,11254252 | 0,00421008 |
| Inhbb | 5,51374715 | 0,31734854 | 1,37758121 | 0,00432629 |

| | | | | |
|---------------|------------|------------|------------|------------|
| 9030025P20Rik | 27,6962321 | 13,4322682 | 0,86410103 | 0,00443528 |
| 2610027K06Rik | 59,7626735 | 35,8991726 | 0,84061643 | 0,00465132 |
| Tmem184a | 523,334056 | 177,757942 | 1,36159479 | 0,00478474 |
| Mmp23 | 16,6627571 | 7,27591064 | 1,00985778 | 0,00493012 |
| Trabd2b | 10,3201448 | 2,94560233 | 1,17891103 | 0,00498456 |
| Zfp366 | 3,92765845 | 0,20651207 | 1,4166771 | 0,00500694 |
| Angptl2 | 107,563558 | 56,1773897 | 0,81984491 | 0,00512081 |
| Olfml2a | 6,85926392 | 0,63693476 | 1,324215 | 0,0058919 |
| Cxcl1 | 52,8355339 | 17,9231031 | 1,13893915 | 0,00604384 |
| D430019H16Rik | 11,9164161 | 2,81065426 | 1,39199841 | 0,0060801 |
| Jag1 | 29,4452887 | 15,0779196 | 0,81066807 | 0,00616268 |
| Smc1b | 2,76091441 | 0,20651207 | 1,37059076 | 0,00628462 |
| Aldh3a1 | 17,0427687 | 4,29551122 | 1,31459819 | 0,00631698 |
| Krt13 | 9,72378813 | 2,82805281 | 1,24398217 | 0,00788387 |
| Arsj | 5,41645834 | 1,36954513 | 1,27042589 | 0,00829008 |
| Col6a2 | 273,873633 | 106,520053 | 1,03035388 | 0,00835309 |
| Ogn | 3,98525579 | 0,63693476 | 1,32659682 | 0,00854978 |
| Rnf122 | 3,5876786 | 0 | 1,27322851 | 0,00886229 |
| Kirrel2 | 4,06673969 | 0,63469708 | 1,3253283 | 0,00902595 |
| Liph | 6,42023457 | 1,5760572 | 1,14773557 | 0,0096683 |
| Tspan15 | 22,8269369 | 9,98641393 | 0,96591205 | 0,0119584 |
| Ocstamp | 9,68021686 | 1,48485696 | 1,14460355 | 0,01393286 |
| Gm7862 | 4,5061093 | 1,0499589 | 1,20735209 | 0,01413077 |
| Snta1 | 14,4163934 | 6,08876599 | 0,96708309 | 0,015174 |

| | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| Thsd7b | 8,16719014 | 3,17398831 | 1,188397 | 0,01627807 |
| Hmgb1-ps3 | 10,1610386 | 4,10863538 | 1,00164038 | 0,01727098 |
| Col12a1 | 29,5351945 | 9,98244148 | 0,97946423 | 0,01751053 |
| Slc28a1 | 1,51058552 | 0 | 0,98215517 | 0,01784198 |
| Gas1 | 44,3357832 | 17,6119646 | 0,99474603 | 0,01839658 |
| Tpbp | 17,1976548 | 7,70633333 | 0,93287743 | 0,01857993 |
| Slpr3 | 54,5558577 | 20,8816286 | 0,94232183 | 0,01888015 |
| Fstl1 | 275,018872 | 125,259473 | 0,87856039 | 0,01895808 |
| Gm7117 | 2,28185332 | 0,20651207 | 1,18104537 | 0,01942679 |
| Hsd11b2 | 9,64052537 | 1,68913135 | 1,13934796 | 0,01966345 |
| Fgf13 | 31,1806594 | 17,4191466 | 0,80689698 | 0,02150124 |
| Slc12a3 | 1,00377623 | 0 | 0,97537886 | 0,02235874 |
| Wisp1 | 35,360833 | 13,3430706 | 0,98044872 | 0,02237125 |
| Cacng7 | 9,01818116 | 4,00848441 | 0,93917819 | 0,02258948 |
| Actg2 | 9,67601498 | 3,24555232 | 0,92701479 | 0,02305384 |
| Fam167a | 6,65484394 | 1,57381951 | 1,01767686 | 0,02427301 |
| Evalc | 6,57336003 | 3,05867648 | 1,11163945 | 0,0243206 |
| Aif1 | 54,7992111 | 23,4638968 | 0,84868591 | 0,02487323 |
| AC153987.1 | 8,01616562 | 3,77165061 | 1,05256569 | 0,02677349 |
| Zfp534 | 3,34322688 | 0,52609829 | 1,12503156 | 0,02681894 |
| Tmem100 | 1,38941013 | 0 | 1,03140092 | 0,0279601 |
| Dnase1l3 | 11,18096 | 1,5760572 | 0,97491358 | 0,02894645 |
| Asb2 | 10,0479449 | 3,55842549 | 1,02730353 | 0,02939609 |
| Cd247 | 15,3186608 | 7,61065773 | 0,94813025 | 0,02951023 |

| | | | | |
|---------------|------------|------------|------------|------------|
| Bend6 | 11,133205 | 4,53905807 | 0,90872316 | 0,03076154 |
| Col16a1 | 43,5483702 | 18,6663989 | 0,89062732 | 0,03076839 |
| Clec4f | 63,6568838 | 5,79278844 | 1,04944643 | 0,03336474 |
| 4930502E18Rik | 1,07331685 | 0 | 0,84104439 | 0,03341233 |
| Ddit4l | 11,9339817 | 5,47146746 | 0,84776617 | 0,0341641 |
| Cd207 | 3,88972765 | 0 | 1,06437925 | 0,03457128 |
| Gpc6 | 11,6596809 | 5,15411892 | 0,83037105 | 0,03466637 |
| A930017K11Rik | 5,62121857 | 2,73909025 | 1,01688461 | 0,03623603 |
| Dcaf12l1 | 8,63254726 | 2,93044146 | 1,00641356 | 0,03657599 |
| Gpr37 | 3,0928126 | 1,16527074 | 1,06684285 | 0,03807821 |
| Ntn1 | 19,0780694 | 7,97769635 | 0,93047436 | 0,03862783 |
| Nkapl | 11,530442 | 5,9801672 | 0,80669822 | 0,03922113 |
| B4galnt3 | 10,9460104 | 6,43246381 | 0,89432984 | 0,04033596 |
| Ttc39d | 0,81095928 | 0 | 0,82404948 | 0,04066625 |
| Gm12664 | 0,81095928 | 0 | 0,82404948 | 0,04066625 |
| 1700024P16Rik | 3,65545854 | 0,63469708 | 1,03712082 | 0,04091674 |
| Sspn | 8,35614547 | 3,16951294 | 0,92175661 | 0,04124776 |
| Ssc5d | 10,3219055 | 4,01295978 | 0,86708132 | 0,04160147 |
| Epb4.1l3 | 70,3293115 | 33,1792156 | 0,82169186 | 0,04231606 |
| Foxd2 | 1,45895075 | 0,20651207 | 0,8954676 | 0,04312438 |
| AC144852.1 | 6,62675549 | 2,53481587 | 0,93211973 | 0,04333174 |
| Gm15731 | 1,48283732 | 0 | 0,889261 | 0,04479118 |
| GM12302 | 1,31986951 | 0 | 0,89269413 | 0,04482166 |
| Lilra5 | 6,55545418 | 3,27811173 | 1,01307054 | 0,04494724 |

| | | | | |
|---------|------------|------------|------------|------------|
| Loxl1 | 16,5433606 | 7,6973826 | 0,80708755 | 0,04502712 |
| Spa17 | 9,39751224 | 3,78681147 | 0,91601136 | 0,04512782 |
| Dclk2 | 288,191864 | 208,459032 | 0,8381586 | 0,04539156 |
| Esm1 | 5,50004318 | 2,00647989 | 0,95814321 | 0,04541969 |
| Cyp4f39 | 11,89395 | 6,75876308 | 0,96872813 | 0,04542702 |
| Gm5939 | 1,42910161 | 0,31958622 | 0,93577073 | 0,04553372 |
| Abcc9 | 2,43287784 | 0 | 1,00167663 | 0,04616703 |
| Gm6257 | 4,27360087 | 1,0499589 | 0,94591691 | 0,04788675 |
| Tlx2 | 1,34761771 | 0,31958622 | 0,92268665 | 0,04879221 |
| Gm12418 | 8,53701913 | 3,67597501 | 0,86390743 | 0,04961127 |
| Zfp532 | 12,7807527 | 5,46922977 | 0,80676916 | 0,04988182 |

Table S4. Principal functional annotations of genes listed in Table S3.

| Term | Count | p-value |
|--|--------------|----------------|
| cell adhesion | 12 | 5,20E-05 |
| positive regulation of cell proliferation | 9 | 8,20E-03 |
| proteolysis | 9 | 1,20E-02 |
| Notch signaling pathway | 7 | 5,40E-05 |
| wound healing | 6 | 1,40E-04 |
| response to drug | 6 | 3,40E-02 |
| cellular response to amino acid stimulus | 5 | 6,10E-03 |
| positive regulation of cell migration | 5 | 2,30E-02 |
| immune response | 5 | 5,70E-02 |
| positive regulation of Notch signaling pathway | 4 | 9,90E-04 |

| | | |
|--|---|----------|
| collagen fibril organization | 4 | 1,20E-03 |
| skin development | 4 | 3,60E-03 |
| positive regulation of canonical Wnt signaling pathway | 4 | 5,40E-03 |
| response to estrogen | 4 | 7,40E-03 |
| negative regulation of neuron differentiation | 4 | 7,70E-03 |
| cell chemotaxis | 4 | 8,30E-03 |
| protein processing | 4 | 1,10E-02 |
| skeletal system development | 4 | 1,90E-02 |
| cell migration | 4 | 8,10E-02 |

Table S5. Principal functional annotations of the 446 genes specifically overexpressed in Ik^{null}-OP9 cells with a log2 \geq 0.8 and p-value<0.05

| Term | Count | p-value |
|---|--------------|----------------|
| negative regulation of transcription from RNA pol II promoter | 18 | 4,00E-02 |
| negative regulation of transcription, DNA-templated | 14 | 8,20E-02 |
| positive regulation of GTPase activity | 12 | 1,00E-05 |
| negative regulation of cell proliferation | 12 | 2,60E-02 |
| metabolic process | 12 | 7,80E-02 |
| aging | 7 | 4,20E-02 |
| endocytosis | 7 | 5,00E-02 |
| cellular response to tumor necrosis factor | 6 | 2,30E-02 |
| negative regulation of cell growth | 6 | 3,70E-02 |
| cytokine-mediated signaling pathway | 6 | 6,30E-02 |

| | | |
|--|---|----------|
| response to mechanical stimulus | 5 | 1,30E-02 |
| positive regulation of endothelial cell proliferation | 5 | 1,70E-02 |
| neutrophil chemotaxis | 5 | 1,80E-02 |
| response to estrogen | 5 | 2,40E-02 |
| transforming growth factor beta receptor signaling pathway | 5 | 2,40E-02 |
| negative regulation of neuron differentiation | 5 | 2,50E-02 |
| integrin-mediated signaling pathway | 5 | 4,70E-02 |
| wound healing | 5 | 4,90E-02 |
| cellular calcium ion homeostasis | 5 | 5,90E-02 |
| negative regulation of cell migration | 5 | 7,00E-02 |
| skeletal system development | 5 | 7,20E-02 |
| chemotaxis | 5 | 9,50E-02 |

Table S6. Principal functional annotations of the 756 genes specifically overexpressed in Ik^{null}-OP9-DL1 cells with a log2 \geq 0.8 and p-value<0.05

| Term | Count | p-value |
|---|--------------|----------------|
| positive regulation of transcription from RNA pol II promoter | 40 | 1,10E-02 |
| multicellular organism development | 39 | 2,90E-02 |
| negative regulation of apoptotic process | 25 | 1,80E-02 |
| negative regulation of transcription, DNA-templated | 23 | 6,10E-02 |
| ion transport | 23 | 6,80E-02 |
| positive regulation of gene expression | 22 | 2,60E-03 |
| immune system process | 20 | 7,60E-03 |
| cell adhesion | 20 | 6,20E-02 |

| | | |
|---|----|----------|
| positive regulation of apoptotic process | 18 | 9,10E-03 |
| negative regulation of cell proliferation | 18 | 3,00E-02 |
| regulation of transcription from RNA polymerase II promoter | 17 | 6,80E-02 |
| innate immune response | 17 | 7,20E-02 |
| actin cytoskeleton organization | 15 | 2,80E-05 |
| regulation of cell proliferation | 15 | 3,30E-03 |
| inflammatory response | 15 | 8,00E-02 |
| angiogenesis | 13 | 2,80E-02 |
| heart development | 12 | 9,30E-02 |
| response to lipopolysaccharide | 11 | 4,00E-02 |
| wound healing | 10 | 9,30E-04 |
| circadian rhythm | 9 | 8,50E-03 |
| kidney development | 9 | 2,40E-02 |
| positive regulation of GTPase activity | 9 | 4,30E-02 |
| protein polyubiquitination | 8 | 2,10E-02 |
| negative regulation of cell migration | 8 | 2,40E-02 |
| protein dephosphorylation | 8 | 7,80E-02 |
| regulation of cell shape | 8 | 8,00E-02 |
| positive regulation of smooth muscle cell migration | 7 | 5,50E-04 |
| positive regulation of interferon-gamma production | 7 | 2,60E-03 |
| negative regulation of angiogenesis | 7 | 1,30E-02 |
| regulation of Rho protein signal transduction | 7 | 1,70E-02 |
| cartilage development | 7 | 2,30E-02 |
| lipid transport | 7 | 7,80E-02 |

| | | |
|--|---|----------|
| extracellular matrix organization | 7 | 8,60E-02 |
| post-embryonic development | 7 | 8,60E-02 |
| chemotaxis | 7 | 9,70E-02 |
| lipoprotein metabolic process | 6 | 1,50E-03 |
| positive regulation of nitric oxide biosynthetic process | 6 | 6,80E-03 |
| T cell receptor signaling pathway | 6 | 1,10E-02 |
| regulation of protein phosphorylation | 6 | 2,50E-02 |
| positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling | 6 | 2,80E-02 |
| positive regulation of smooth muscle cell proliferation | 6 | 6,30E-02 |

Table S7. Oncogenes and tumor suppressors listed in the 223 genes with an additive effect (Figure 1A and 2A).

| Protein | Details if needed | Tumor Suppressor | Oncogene | Tissus |
|---------|-------------------|------------------|----------|--|
| SMAD6 | | X | | NSCLC (Jeon, Dracheva et al. 2008), oral squamous cell carcinoma (Mangone, Walder et al. 2010) |
| | | | X | Breast cancer (de Boeck, Cui et al. 2016), pancreatic cancer (Kleeff, Maruyama et al. 1999) |
| TGIF1 | | | X | Colorectal cancer (Wang, Qi et al. 2017), NSCLC (Xiang, Yi et al. 2015), esophageal squamous cell carcinoma (Wang, Pan et al. 2017), triple-negative breast cancer (Zhang, Ferrigno et al. 2015) |
| | | X | | MLL-rearranged AML (Willer, Jakobsen et al. 2015) |
| CDH5 | | | X | Gastric cancer (Higuchi, Inokuchi et al. 2017, Inokuchi, Higuchi et al. 2017) glioblastoma (Mao, Xue et al. 2013) |

| | | | | |
|----------------|--|---|---|---|
| P21 | | X | | Prostate cancer (Li, Wang et al. 2017), endometrial cancer (Yamawaki, Ishiguro et al. 2017), thyroid cancer (Lei, Shen et al. 2016), esophageal cancer (Luo, Zhang et al. 2016), AML (Geyer 2010, Zhang, Ma et al. 2015), CML (Chen, Zhou et al. 2016), promyelocytic leukemia (Atashrazm, Lowenthal et al. 2016), osteosarcoma (Xu, Jiang et al. 2017), colorectal cancer (Zhang, Shim et al. 2016, Wang, Guo et al. 2017) |
| | | | X | Prostate cancer (Jain, Raina et al. 2013), hepatocarcinoma (Ohkoshi, Yano et al. 2015) |
| DLC1 | | X | | Gastric cancer (Su, Lin et al. 2015), hepatocarcinoma (Wang, Qian et al. 2016, Wu, Xie et al. 2018), lung squamous cell carcinoma (LSC), lung adenocarcinoma, breast cancer (Wang, Qian et al. 2016) |
| EIF2AK2 | | X | | highly metastatic breast cancer, prostate cancer and colorectal adenocarcinoma (Kim and Cho 2017) |
| P53 | | X | | Several cancers (reviewed in (Aubrey, Strasser et al. 2016)) |
| ARF4 | | | X | Breast, lung cancer and glioma (Casalou, Faustino et al. 2016), epithelial ovarian cancer (Wu, Ren et al. 2018) |
| AXL | | | X | Ovarian (Kanlikilicer, Ozpolat et al. 2017), colorectal cancer (Uribe, Mandell et al. 2017), breast cancer (Goyette, Duhamel et al. 2018), and others (Corno, Gatti et al. 2016, Rankin and Giaccia 2016), NSCLC (Zhang, Wang et al. 2018), AML (Hong, Lay et al. 2008, Janning, Ben-Batalla et al. 2015), B-CLL (Sinha, Boysen et al. 2016), CML (Dufies, Jacquel et al. 2011) |
| CD38 | | X | | CML (Wang, Liu et al. 2014), B-ALL (Jiang, Wu et al. 2016), prostate cancer (Liu, Grogan et al. 2016) |
| | | | X | Lung (Bu, Kato et al. 2018), cervical carcinoma (Liao, Xiao et al. 2014, Liao, Xiao et al. 2017), multiple myeloma (van de Donk, Janmaat et al. 2016), Immunosuppression and tumor escape (Chen, Diao et al. 2018), T-CLL (Manna, Lewis- |

| | | | | |
|--|--|---|---|--|
| | | | | Tuffin et al. 2018), B-CLL (Xu, Li et al. 2009) |
| SH3RF1 | | X | | Skin cancer (Ying, Sandoval et al. 2018), lung adenocarcinoma (Wang, Bie et al. 2018) |
| ADAR | | | X | NSCLC (Amin, Liu et al. 2017) |
| GAS6 (binds to TAM family receptors (example: AXL)) | | | X | Colon , thyroid, breast, lung carcinomas, ovarian cancer and others (reviewed in (Wu, Ma et al. 2017) and AML (Lee-Sherick, Eisenman et al. 2013, Whitman, Kohlschmidt et al. 2014) |
| | | X | | Colorectal cancer (Akitake-Kawano, Seno et al. 2013) |
| IL6 | | | X | Ovarian cancer (Zou, Zhang et al. 2016), gastric cancer (Wu, Tao et al. 2017), hematological malignancies (reviewed in (Burger 2013) |
| SGK1 | | | X | Colorectal cancer (Liang, Lan et al. 2017), glioblastoma multiforme (Lehrer, Rheinstein et al. 2018), thyroid cancer (Orlacchio, Ranieri et al. 2017), NSCLC (Tang, Shen et al. 2018), breast cancer (Sahoo, Brickley et al. 2005, Eirew, Steif et al. 2015) |
| MDM2 | | | X | Several cancers (reviewed in (Zhao, Yu et al. 2014, Karni-Schmidt, Lokshin et al. 2016) |
| CSF-1 | | | X | Myeloproliferative neoplasms (Gilbert, Praloran et al. 1989), tumor-associated macrophages (Thompson, Jackson et al. 2018), breast cancer (Richardson, Uglehus et al. 2015), lymphoid neoplasms (Janowska-Wieczorek, Belch et al. 1991) |
| TRAF5 | | X | | Diffuse large B-cell lymphoma (Compagno, Lim et al. 2009) |
| MAGE-D1 (or NRAGE) | | X | | Breast (Du, Zhang et al. 2009), pancreatic (Chu, Xue et al. 2007), colorectal cancers (Zeng, Wu et al. 2012) |
| SOX12 | | | X | Hepatocellular carcinoma (Huang, Chen et al. 2015, Yuan, Meng et al. 2017), AML (Wan, Cai et al. 2017) |
| AHR | | | X | Several cancers (reviewed in (Dietrich and Kaina 2010, Feng, Cao et al. 2013) |

| | | | | |
|---------------|--|---|---|--|
| SNAI1 | | | X | Breast cancer (Dhasarathy, Phadke et al. 2011), ovarian carcinoma (Jin, Yu et al. 2010), prostate cancer (Deep, Jain et al. 2014), AML (Carmichael, Goossens et al. 2016) |
| MAFb | | | X | T-ALL (Pajcini, Xu et al. 2017), nasopharyngeal carcinoma (Yang, Lan et al. 2015) |
| PTGER4 | | X | | B-lymphoma (Murn, Alibert et al. 2008) |
| | | | X | Gastric cancer (Heinrichs, Hess et al. 2018), breast cancer (Hiken, McDonald et al. 2017), AML (Shin, Brynczka et al. 2016) |
| NFKBIE | | X | | primary mediastinal B-cell lymphoma (Mansouri, Noerenberg et al. 2016), B-CLL (Mansouri, Sutton et al. 2015) |
| CD300a | | | X | AML (Sun, Huang et al. 2018), diffuse large B-cell lymphoma (Jiang, Xu et al. 2015) |
| | | X | | NSCLC (Tang, Cai et al. 2018) |
| B2M | | | X | AML (Melillo, Cascavilla et al. 1992), ALL (Thomas, Brien et al. 2009) |
| C1QA | | X | | Ovarian (Kaur, Sultan et al. 2016), prostate cancer (Hong, Sze et al. 2009), mammary carcinoma (Bandini, Macagno et al. 2016) |
| NOD1 | | X | | Breast (Velloso, Sogayar et al. 2018) and colon cancers (Chen, Shaw et al. 2008) |
| CCL24 | | | X | Hepatocellular carcinoma (Jin, Liu et al. 2016), colorectal neoplasm (Alderton 2011, Cho, Lim et al. 2016) |
| CXCL16 | | | X | NSCLC (Ke, Ren et al. 2017), prostate, breast, ovarian, colon, liver (Darash-Yahana, Gillespie et al. 2007) |
| MMP14 | | | X | Nasopharyngeal carcinoma (Yan, Lin et al. 2015), triple-negative breast cancer (Ling, Watt et al. 2017), lymphoma (Cathcart, Banach et al. 2016) (via IL6), AML (Shirvaikar, Jalili et al. 2008) |
| MYLK | | X | | NSCLC (Tan and Chen 2014) |
| SEMA4C | | | X | Breast and ovarian cancers (Wei, Yang et al. |

| | | | | |
|-------------------------------------|----------------|---|---|---|
| | | | | 2017, Gurrapu, Pupo et al. 2018) |
| S1PR1 | | | X | AML (Xu, Huang et al. 2016), hodgkinien lymphoma (Vrzalikova, Ibrahim et al. 2018), mammary carcinoma (Weichand, Popp et al. 2017), B-lymphoma (Liu, Deng et al. 2012) |
| | | X | | CLL (Patrussi, Capitani et al. 2015) |
| ABCC1 (MRP1) | | | X | AML (Paprocka, Bielawska-Pohl et al. 2017), glioblastoma (Guimaraes, Rocha et al. 2017), small cell lung cancer (Liu, Wu et al. 2015), epithelial ovarian (Sedlakova, Laco et al. 2015), and colorectal cancer (Abdallah, Fanelli et al. 2016), CML (Chen, Jia et al. 2016) |
| LOX | Mature peptide | | X | Myeloproliferative neoplasms (Tadmor, Bejar et al. 2013, Matsuura, Mi et al. 2016), oral squamous cell carcinoma (Shih, Chang et al. 2013), breast cancer (Kirschmann, Seftor et al. 2002) |
| | pro-peptide | X | | Gastric (Kaneda, Wakazono et al. 2004) and prostate cancer (Bais, Ozdener et al. 2015), hepatocellular carcinoma (Zheng, Wang et al. 2014), osteosarcoma (Xu, Wang et al. 2013) |
| OXTR (Oxytocin) | | | X | Prostate cancer (Zhong, Boseman et al. 2010) |
| | | X | | Ovarian (Morita, Shibata et al. 2004) and breast cancer (Cassoni, Sapino et al. 1996, Cassoni, Sapino et al. 1997, Benavente, Bianchi et al. 2016) |
| PGF (placenta growth factor) | | | X | Colorectal cancer (Escudero-Esparza, Martin et al. 2009), Ph+ALL (Ikai, Miwa et al. 2005), breast cancer (Parr, Watkins et al. 2005) |
| MIXL1 | | | X | AML (Raymond, Liu et al. 2014), non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas (Drakos, Rassidakis et al. 2007) |
| ADM (Adrenomedullin) | | | X | Ovarian, breast, lung, prostate cancers and glioblastoma, melanoma (Zudaire, Martinez et al. 2003), AML (Di Liddo, Bridi et al. 2016) |

| | | | | |
|---|--|---|---|--|
| ECE-1 (Endothelin converting enzyme 1) | | | X | Breast (Smollich, Gotte et al. 2007) and ovarian (Rayhman, Klipper et al. 2008) |
| ZFP36L1 | | X | | T-ALL (Hodson, Janas et al. 2010), AML (Chen, Dong et al. 2015), B-malignancies (Zekavati, Nasir et al. 2014), bladder and breast cancer (Loh, Ding et al. 2017), colorectal cancer (Suk, Chang et al. 2018) |
| TRIM26 | | X | | Hepatocellular carcinoma (Wang, He et al. 2015), NSCLC (Yi, Huang et al. 2016) |
| COL5A1 | | | X | Lung adenocarcinoma (Liu, Wei et al. 2018), breast invasive ductal carcinoma (Ren, Zhang et al. 2018) |
| ITGAX | | | X | Ovarian (Wang, Yang et al. 2018) and prostate cancers (Williams, Lee et al. 2014) |
| LAMA4 | | | X | Renal cell carcinoma (Wragg, Finty et al. 2016), triple-negative breast cancer (Yang, Zhang et al. 2018), gastric cancer (Wang, Hou et al. 2018) |
| PECAM-1 | | | X | Ph+ leukemias (Wu, Kurosu et al. 2013), AML (Sun, Huang et al. 2018) |
| SORBS3 | | X | | Hepatocellular carcinoma (Ploeger, Waldburger et al. 2016) |
| ALDOC | | | X | Colorectal cancer (Caspi, Perry et al. 2014) |
| NR4A1 | | X | | AML (Mullican, Zhang et al. 2007), myeloproliferative neoplasms (Ramirez-Herrick, Mullican et al. 2011, Wenzl, Troppan et al. 2015), aggressive lymphoma (Deutsch, Rinner et al. 2014), triple-negative breast cancer (Wu, Bi et al. 2017), gastric cancer (Yan, Xiao et al. 2017) |
| | | | X | NSCLC (Zhu, Yang et al. 2017) |
| APELIN | | | X | Gastric cancer (Feng, Yao et al. 2016), lymphoma (Berta, Hoda et al. 2014) |

| | | | | |
|----------------|--|---|---|---|
| CRLF1 | | | X | Papillary thyroid carcinoma (Yu, Zhong et al. 2018) |
| EPHB2 | | X | | Prostate (Huusko, Ponciano-Jackson et al. 2004) and colorectal cancers (Jubb, Zhong et al. 2005, Guo, Zhang et al. 2006) |
| | | | X | Cervical cancer (Gao, Liu et al. 2014) |
| LIMK1 | | | X | NSCLC (Jang, Jeon et al. 2012), pancreatic (Vlecken and Bagowski 2009), gastric (You, Gao et al. 2015), colorectal (Zhang, Li et al. 2018) and colon cancers (Su, Zhou et al. 2017), AML (Pandey, Mali et al. 2015) and highly invasive breast and prostate cancers (Antonipillai and Francis 2018) |
| MINK1 | | | X | Breast cancer (Daulat, Bertucci et al. 2016) |
| | | X | | In Ovarian Surface Epithelial Cells transformation (Nicke, Bastien et al. 2005) |
| PIP5K1A | | | X | Prostate (Semenas, Hedblom et al. 2014) and breast cancers (Sarwar, Syed Khaja et al. 2018) |

Table S8. Oncogenes and tumor suppressors listed in the 115genes corresponding to genes that are no more significantly responsive to NOTCH activation in Ik^{Null} (Figure 2B).

| Protein | Details if needed | Tumor suppressor | Oncogene | Tissus |
|-----------------|-------------------|------------------|----------|--|
| LRIG1 | | X | | Malignant glioma (Mao, Holmlund et al. 2018), duodenal adenomas (Powell, Wang et al. 2012), breast cancer (Krig, Frietze et al. 2011), EGFR-mutant NSCLC (Torigoe, Yamamoto et al. 2018) |
| NRARP | | | X | Thyroid cancer (Chu, Qin et al. 2016); breast cancer (Imaoka, Okutani et al. 2014), NSCLC (Liao, Chen et al. 2018) |
| PRDM16 | short isoform | | X | Prostate cancer (Zhu, Xu et al. 2016), AML (Yamato, Yamaguchi et al. 2017) |
| | long isoform | X | | Renal cell carcinoma (Kundu, Kho et al. 2018), MLL-AF9 Leukemic Transformation (Zhou, Wang et al. 2016) |
| PADI-2 | | | X | Prostate cancer (Wang, Song et al. 2017), breast cancer (McElwee, Mohanan et al. 2012), skin neoplasia (McElwee, Mohanan et al. 2014), multiple myeloma (McNee, Eales et al. 2016) |
| GPR37 | | | X | Gastric cancer (Wang, Hu et al. 2016), multiple myeloma (Huang, Wang et al. 2013) |
| | | X | | Hepatocellular carcinoma (Liu, Zhu et al. 2014) |
| NKAPL | | X | | Hepatocellular carcinoma (Ng, Lau et al. 2018) |
| B4GALNT3 | | X | | Neuroblastoma (Hsu, Che et al. 2011) |
| | | | X | Colorectal cancer (Che, Huang et al. 2014), papillary thyroid carcinoma (Costa, Esposito et al. 2015) |

Table S9. List of the 223 genes with an additive effect (Figure 1A and 2A).

| | | | | | |
|----------|-----------|-------------------|----------------|-------------------|------------|
| Smtnl2 | Serinc2 | S1pr1 | Gm6548 | Mnda | Entpd1 |
| Mocs1 | Rasgef1b | Gm15471 | Cdc42ep2 | Gbp9 | Efnb3 |
| Ttc23 | Tmem27 | H2-Q2 | AC14219 1.1 | Ephb2 | Csf1 |
| Slc25a44 | Adamts3 | Atp1b2 | C1ra | Deptor | Usp42 |
| Myo15 | Pisd-ps2 | B2m | Sh3rf1 | Trim26 | Adora3 |
| Cdh5 | Serpib6a | Aqp9 | Clec2d | Disp2 | Adar |
| Fam65c | Aldh1a3 | Mixl1 | Ahr | Tor1aip1 | AC155814.1 |
| Cd97 | Hexim2 | Arf4 | Irf9 | Gas6 | C1qc |
| Gpr124 | Gltg | Slc5a3 | Gm11837 | Ccbe1 | Dlc1 |
| Fam160a1 | Itgax | 1700012L04 Rik | Dcaf11 | 4930563E22 Rik | Nudt13 |
| Maged1 | Ccl24 | Tmem86a | Psme2 | Tgif1 | Apln |
| Ap5s1 | Gm7592 | Luzp1 | AC12433 6.1 | Gapdh | Ankfy1 |
| Abcc1 | Mfap3l | Mdm2 | Ifi35 | Mcpt4 | Zfp334 |
| Ptger4 | Serpina3h | Zfp446 | Rnf31 | Snora28 | Kcnj12 |
| Dync1h1 | Wdr19 | C1qa | Nr4a1 | Smad6 | Mpz13 |
| Mmp14 | Slc26a2 | Eif2ak2 | Tgfb1i1 | C920025E04 Rik | Lama4 |
| Cox6b2 | Mink1 | Adra2b | Psme2b- ps | 9130020K20 Rik | Spata31d1d |
| H2-M2 | Suv420h2 | Cd38 | Cdkn1a | Oxtr | Gm10651 |
| Mylk | Snai1 | AC164093.1 | Tnks1bp1 | AC154274.1 | H2-T24 |
| Glt28d2 | Med12l | Vps33b | Chd3 | Soga1 | Gm15920 |
| Ecm1 | Traf5 | AW011738 | Cdhr4 | Limk1 | Axl |

| | | | | | |
|-------------------|-------------------|-------------------|----------|-------------------|-------------------|
| Dnahc1 | Zfp595 | AC162692.1 | Npl | 2310042D19 Rik | Doc2g |
| Mafb | Wdr91 | Zfp953 | Sorbs3 | Mustn1 | Pilra |
| Tmem47 | Itga5 | Cxcl16 | Zfp58 | Zfp112 | Sema4c |
| Pdzk1ip1 | Mtcp1 | Gm12522 | Kctd20 | Serpinb9 | Trim12c |
| Radil | Pip5k1a | Ak1 | Tnfrsf23 | Sytl5 | Aspa |
| Mmp13 | Ms4a7 | Pmepa1 | Hyal1 | Gm14005 | 4933433C11 Rik |
| Chd5 | Nudt8 | Crtc1 | Cd300a | Notch3 | Zcchc2 |
| Sept1 | Pecam1 | Sgk1 | Col1a2 | Cdc34-ps | Pnpt1 |
| Trp53 | Ptk2b | C130050O18 Rik | Cc2d2a | Pgf | Il6 |
| Ece1 | Acacb | St5 | Stac2 | Nod1 | Phfl1c |
| Zfp3611 | Cdc42ep5 | Tgif2 | AI606181 | Lox | Nsmaf |
| Sox12 | D630023F18 Rik | Gpatch11 | Rbfox2 | Fam118b | A730061H03 Rik |
| Fyco1 | Crlf1 | Aldoc | Nfkbie | Lair1 | Cd4 |
| Tenc1 | Lbh | Ogfr | Stxbp1 | Gm3695 | Zfp101 |
| Pls3 | Ly6c1 | Pyroxd2 | Il17rc | Ggt5 | 9830147E19 Rik |
| Adm | Dzip11 | Col5a1 | Ppa1 | Gm13086 | A730011C13 Rik |
| B230307C23 Rik | | | | | |

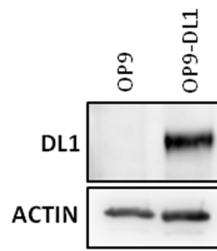


Figure S1. Expression of the Delta-like 1 ligand in OP9 cells. Western blot analysis of Delta-like 1 (DL1) and ACTIN (control) in whole-cell extracts of OP9 or OP9-DL1 cells.

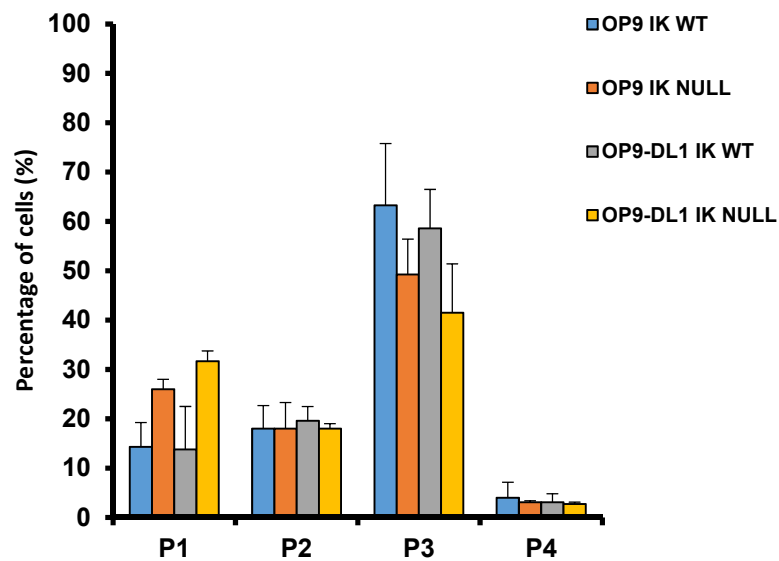


Figure S2. Erythroid population distribution in Ik^{Null} and Ik^{WT} mouse fetal liver cells co-cultured with either OP9 or OP9-DL1 cells. After 48 hours of co-culture with OP9 or OP9-DL1 cells, Ik^{Null} and Ik^{WT} e14.5 fetal liver cells were collected and sorted by FACS on the basis of Ter119 and CD71 expression levels: P1, $CD71^{med}$ $Ter119^{neg/low}$; P2, $CD71^{high}$ $Ter119^{neg/low}$; P3, $CD71^{high}$ $Ter119^{high}$; P4, $CD71^{med}$ $Ter119^{high}$. P1 is enriched in erythroid

precursors (BFU-E and CFU-E), P2 is enriched in proerythroblasts and early basophilic erythroblasts, P3 is enriched in basophilic and chromatophilic erythroblasts, and P4 is enriched in orthochromatic erythroblasts.

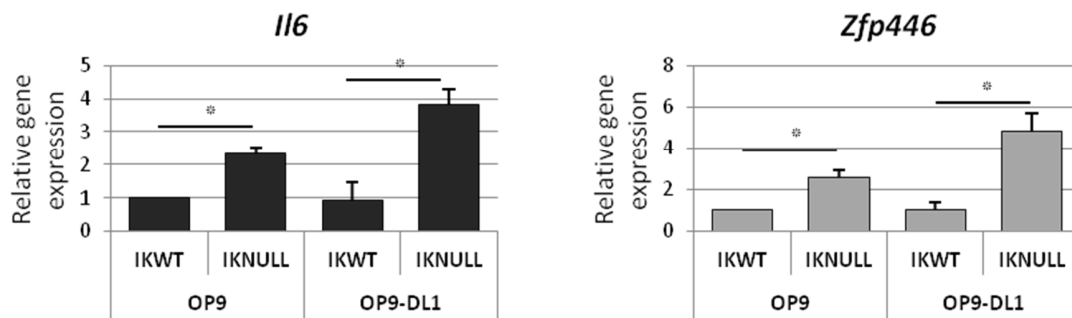


Figure S3. *Il6* and *Zfp446* gene expressions in Ik^{Null} and Ik^{WT} mouse fetal liver EryC upon activation of the NOTCH pathway. Relative expression of *Il6* and *Zfp446* genes measured by RT-qPCR. The relative expression was calculated according to the control condition OP9 Ik^{WT} and using *Hprt* as the internal control (*: $p \leq 0.05$ by Student's t test; $n=3$).

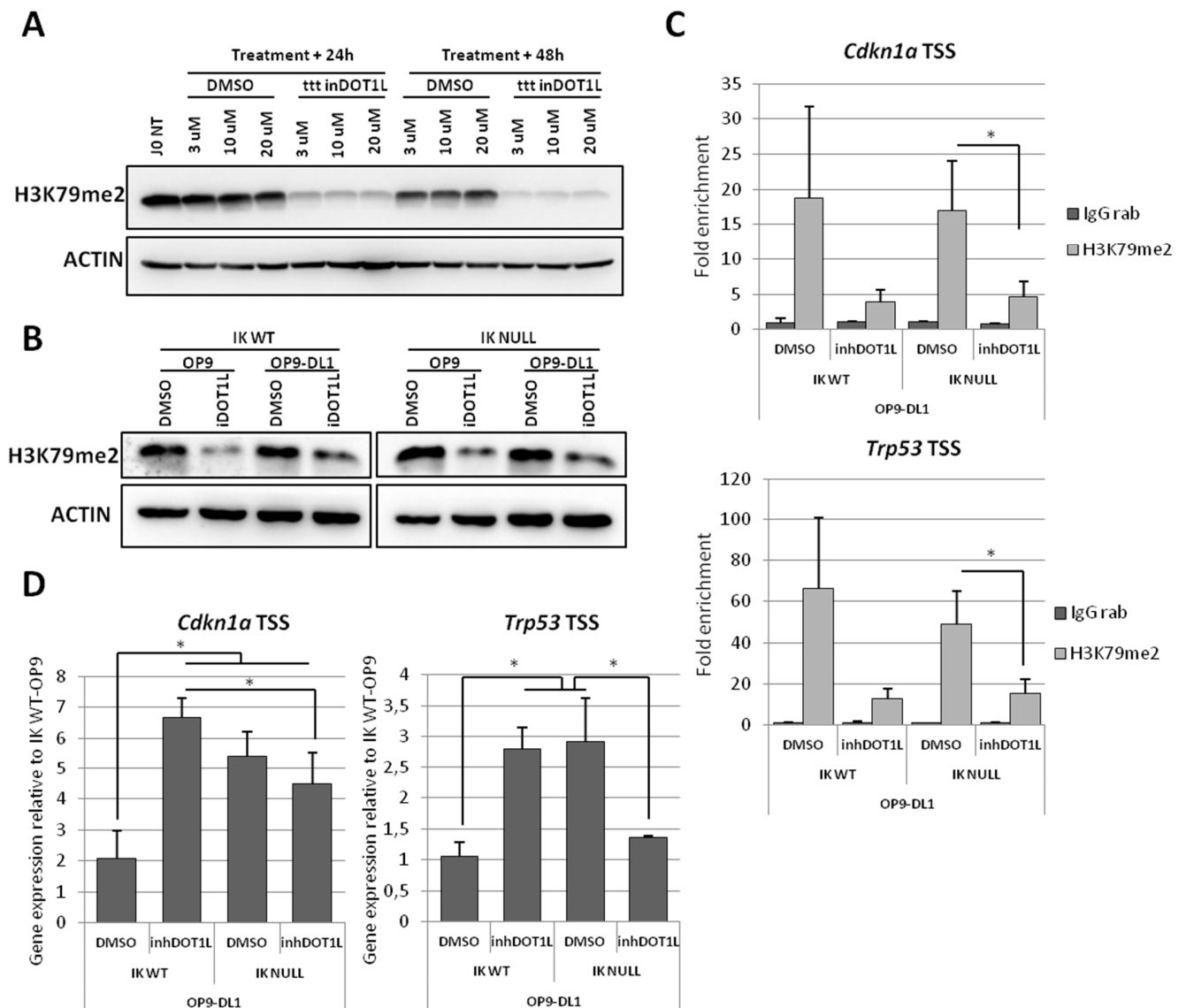


Figure S4. Effect of DOT1L inhibition on *Cdkn1a* and *Trp53* gene expressions in *Ik^{Null}* and *Ik^{WT}* mouse fetal liver EryC upon NOTCH pathway activation. (A) Western blot analysis of H3K79me2 and ACTIN (control) in whole-cell extracts of G1E-ER4 cells treated for 24 or 48 hours either with 3, 10, 20 uM DOT1L inhibitor (iDOT1L: EPZ004777) or equal volume of DMSO (DMSO). (B-D) Fetal liver *Ik^{Null}* and *Ik^{WT}* EryC after 48 hours of co-culture on OP9 or OP9-DL1 cells and treatment 3uM DOT1L inhibitor (inhDOT1L) or equal volume of

DMSO (DMSO). (B) Western blot analysis of H3K79me2 and ACTIN (control) in whole-cell extracts; (C) Relative expression of *Cdkn1a* (left panel) and *Trp53* (right panel) genes. The relative expression measured by RT-qPCR was calculated according to Pfaffl method using *Hprt* as the internal control. Standard deviations (SD) are indicated; n=3; (D) ChIP assays were carried out with the H3K79me2 antibody or isotype-matched immunoglobulin G (rabbit) as the negative control; y-axis: fold enrichments of *Cdkn1a* (upper panel) and *Trp53* (lower panel) TSS regions relative to *Thp1* promoter and input samples are plotted as the mean \pm SD of the measurements; a value of 1 indicates no enrichment; n=3; *: $p < 0.05$ by Student's test.

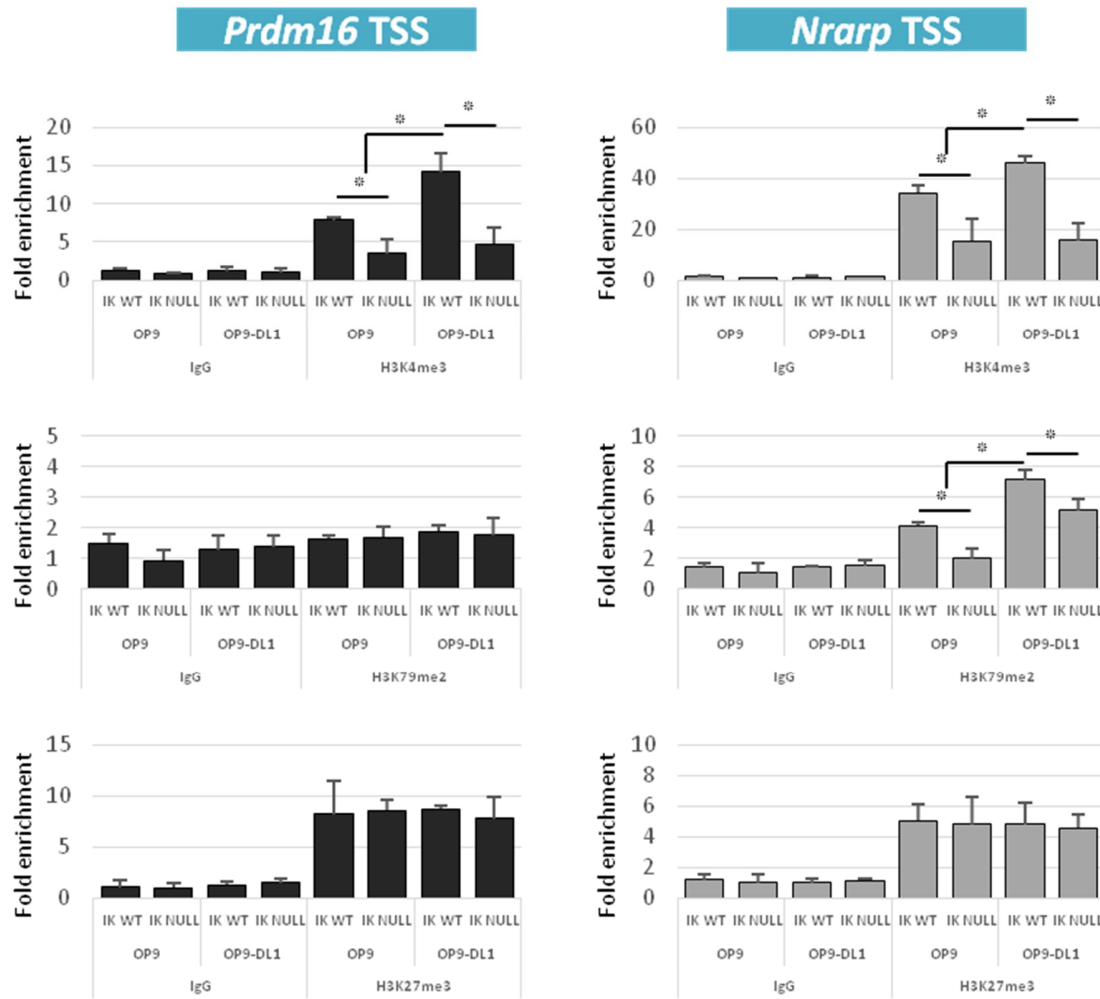


Figure S5. Enrichment of histone post-translational modifications related to transcription activation and elongation at both *Prdm16* and *Nrarp* genes in *Ik^{Null}* and *Ik^{WT}* mouse fetal liver EryC co-cultured with OP9 or OP9-DL1 cells. Bar graphs are presenting the relative recruitment of H3K4me3, H3K79me2 or H3K27me3 to the *Prdm16* and *Nrarp* genes (TSS), expressed as fold enrichment and with standard deviations. The ChIP assay was performed with anti-H3K4me3, anti-H3K79me2, anti-H3K27me3 or isotype-matched immunoglobulin G (rabbit) and analyzed by qPCR. The fold enrichment was

calculated using *Thp1* promoter region as the internal control; a value of 1 indicates no enrichment . *: $p \leq 0.05$ by Student's t test; n=3.

3. Caractérisation du rôle du facteur IKAROS dans l'hydroxyméthylation des gènes cibles de la voie NOTCH.

Dans ce second chapitre, nous nous sommes intéressés à un autre aspect de régulation des gènes : la méthylation de l'ADN. Ces travaux, initiés par d'autres étudiants du laboratoire, ont été poursuivis lors de mes études doctorales. J'ai ensuite majoritairement produit les résultats présentés dans cette section.

3.1. Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est un évènement inhérent dans la régulation des gènes. En fonction du patron de méthylation (emplacement et fréquence de la méthylation des CpG) et suivant l'emplacement des groupements méthyle, le gène ciblé sera réprimé (promoteurs/enhancers) ou bien activé (corps du gène) (75). En influençant le recrutement de protéines liant l'ADN ou de modificateurs d'histone, la méthylation entraîne en majeure partie une répression des gènes. L'ajout d'un groupement méthyle (CH_3) s'opère sur les bases cytosines de l'ADN, et exclusivement dans un contexte cytosine suivie d'une guanine (appelé dinucléotide CpG). Environ 70% des CpG du génome entier sont méthylés et chaque portion du génome contenant un regroupement de CpG est appelé îlot CpG (76).

La modification des cytosines peut être déposée *de novo* ou en maintenance et son retrait de l'ADN peut se faire en plusieurs étapes, lesquelles sont de mieux en mieux définies dans la littérature (77-79). Les enzymes en charge du dépôt du groupement méthyle sont appelées DNMT (pour « DNA methyltransferase ») et sont au nombre de trois. La cytosine alors méthylée portera le nom de 5-méthylcytosine (5-mC). L'enzyme DNMT1 opère en maintenance sur du matériel hémiméthylé dans un complexe de réplication ou de réparation

d'ADN (80). Les enzymes DNMT3A et DNMT3B opèrent quant à elles *de novo* sur l'ADN (81).

Selon les différents signaux détectés par la cellule, la réponse passe impérativement par la variation de l'expression des gènes ciblés. Si le gène ciblé est réprimé et associé à un patron de méthylation de l'ADN qui est répressif pour la transcription, son activation transcriptionnelle nécessitera l'usage d'une des voies possibles pour procéder à sa déméthylation/modification du patron de méthylation.

La répression d'un gène peut être levée au moyen de deux voies distinctes : passive et active. Au cours des cycles cellulaires, les marques épigénétiques s'estompent et disparaissent si aucun facteur ne vient renouveler la marque après la réplication de l'ADN: c'est la voie passive. La seconde voie requiert l'action de facteurs enzymatiques appelés TET (pour « Ten-Eleven-Translocation ») et dont la famille regroupe trois membres : TET1, TET2 et TET3 (82).

3.2. Notions de base sur l'hydroxyméthylation

Il a fallu presque soixante années après la découverte de l'hydroxyméthylation pour mettre en évidence, en 2009, les facteurs produisant cette marque (modification). Les facteurs TET sont des dioxygénases dépendantes du 2-oxyglutarate (2-OG) et du fer (II) et qui possèdent un domaine catalytique permettant de convertir une cytosine méthylée en une cytosine hydroxyméthylée (5-hmC) par le phénomène d'oxydation (83). À ce stade, la marque 5-hmC peut soit disparaître par cycle cellulaire, soit être de nouveau oxydée par les TET en 5-formylcytosine (5-fC) puis éventuellement en 5-carboxylcytosine (5-caC), lesquelles sont reconnues spécifiquement par l'enzyme TDG (pour « Thymine DNA Glycosylase ») qui

excise la base. Le site abasique est alors pris en charge par le système de réparation BER (pour « Base Excision Repair ») qui va régénérer une cytosine non modifiée (Figure 10) (77).

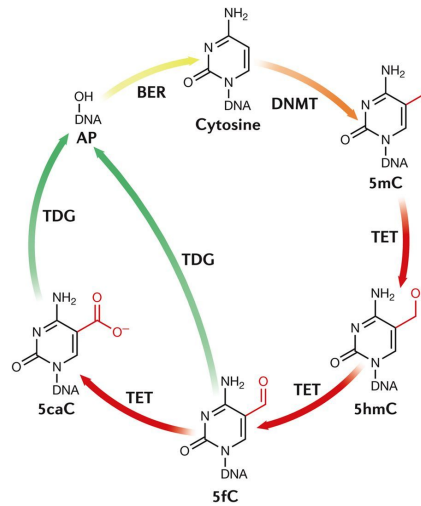


Figure 10: Cycle de méthylation/déméthylation active des cytosines.

(Adapté de la référence (84))

En fonction des signaux détectés, les enzymes DNMT 1, 3a et 3b vont procéder à la méthylation des cytosines, dans un contexte C-G (flèche orange) (5mC). Le groupement méthyle est illustré par un trait rouge sur la représentation chimique de la molécule. Selon les besoins cellulaires, la déméthylation active est engagée et les protéines TET 1-3 viennent oxyder le groupement méthyle de(s) la cytosine(s) ciblée(s) (flèche rouge). À ce stade, on parle de cytosine hydroxyméthylée (5hmC) et plusieurs autres cycles d'oxydation peuvent se produire, aboutissant à l'apparition d'une cytosine formylée (5fC) puis carboxylée (5CaC). L'enzyme TDG peut prendre en charge les cytosines durant ces deux dernières étapes afin d'en exciser la base (flèche verte). Ce processus permet ensuite au complexe de réparation BER de régénérer une nouvelle cytosine, dénuée de toute modification (flèche jaune).

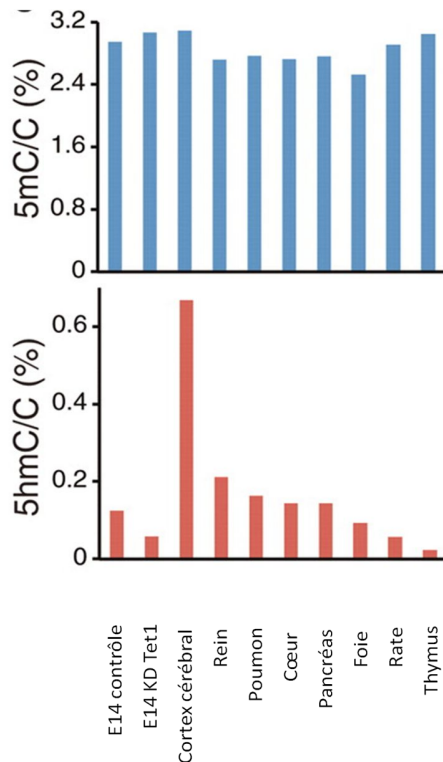
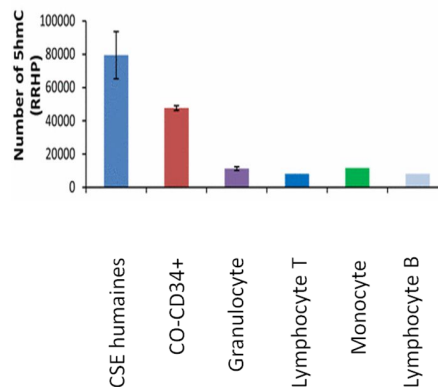
A**B**

Figure 11. Quantification du contenu génomique en 5-hmC dans différents tissus et types cellulaires.

A) La quantification de 5mC et 5hmC a été obtenue par spectrométrie de masse dans différents tissus murins. Le résultat a été traduit en pourcentage du nombre total de cytosine et regroupe les données de deux expériences indépendantes. E14 contrôle : cellules souches embryonnaires (CSE) au jour 14.5 ; E14 KD Tet1 : CSE avec diminution d'expression (pour « Knock-Down ») de Tet1 (figure modifiée, adaptée de la référence (85)). B) Distribution des niveaux de 5hmC dans les cellules hématopoïétiques humaines par analyse RRHP (pour « Reduced Representation 5-Hydroxymethylcytosine Profiling ») de leur génome entier. Le graphique regroupe les données de différents types cellulaires d'origine humaine dont les CD34+ provenant du cordon ombilical (CO-CD34+). Les cellules souches embryonnaires humaines ont été ici utilisées comme contrôle positif (figure modifiée, adaptée de la référence (86)).

Dans les cellules de mammifères, la 5-mC caractérise 5% des cytosines et la 5-hmC environ 0,5%. Les bases 5-fC et 5-caC ne sont quant à elles présentes qu'à de très faibles pourcentages, mettant plutôt en évidence un rôle biologique de la marque épigénétique 5-hmC (85, 87).

La déméthylation active est notamment requise dans les étapes précoces d'embryogenèse, permettant un remodelage rapide des motifs de méthylation du génome du zygote mâle et des cellules germinales primordiales (88, 89). Elle est aussi retrouvée sur certains *loci* spécifiques qui nécessitent une réponse rapide à des stimuli environnementaux. L'hydroxyméthylation représente un état intermédiaire avant la déméthylation totale de la cytosine. Elle est particulièrement enrichie dans le système nerveux central (Figure 11 ; (90, 91)) mais reste tout de même présente à des niveaux non négligeables dans les autres organes/tissus et dans les cellules souches embryonnaires murines où on la retrouve à un ratio de 1.3×10^3 pour 10^6 cytosines (85, 90).

3.3. L'hydroxyméthylation dans les cellules souches embryonnaires et les progéniteurs érythroïdes

Elle est entre autres enrichie au niveau des enhancers et TSS dans les cellules souches embryonnaires, en corrélation avec les marques H3K4me1 et H3K27ac, suggérant qu'elle ait un rôle dans la régulation transcriptionnelle des gènes. La présence de 5-hmC détectée sur les promoteurs est quant à elle plutôt liée à des gènes bivalents, qui sont réprimés dans les cellules souches embryonnaires mais activés pendant leur différenciation (92, 93). La 5-hmC serait présente préférentiellement sur des gènes de pluripotence et de développement dans les

cellules souches embryonnaires et serait majoritairement dépendante de l'activité de l'enzyme TET1 (92, 94-97).

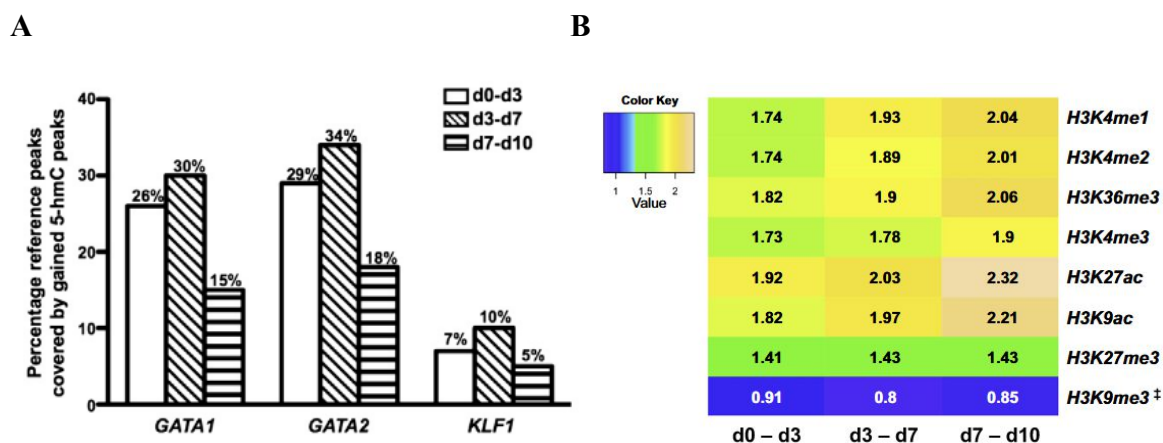


Figure 12. Corrélation entre la présence de 5-hmC, de marques épigénétiques activatrices et de facteurs de transcription caractéristiques du développement érythroïde.

(Adapté de la référence (98))

A) Pourcentage de chevauchement entre les pics GATA1, GATA2 et KLF1 obtenus par données ChIP-seq (99-101) et les pics de gain en 5-hmC à travers les jours 0-3 (blanc), 3-7 (hachuré) et 7-10 (rayé) du modèle de différenciation érythroïde utilisé dans l'article d'origine (98). B) Chevauchement relatif entre la distribution des modifications d'histones (102) et les pics de gain en 5-hmC, à travers le modèle de différenciation érythroïde de l'article d'origine. Code couleur : jaune/enrichissement fort ; vert/enrichissement moyen ; bleu/enrichissement faible.

TET1 a été la première enzyme TET étudiée étant donné qu'elle représente la protéine TET la plus fortement exprimée dans les cellules souches embryonnaires (83, 92). Les découvertes scientifiques concernant les facteurs responsables de la 5-hmC n'ont cessé d'éclore depuis

2009. Depuis, TET2 a aussi été retrouvée fortement exprimée dans les cellules souches embryonnaires mais aussi dans les progéniteurs érythroïdes (98).

De façon intéressante, par expérience ChIP-seq et hMe-Seal, une équipe a constaté qu'au cours de l'érythropoïèse humaine, 15 à 34 % des pics de présence des facteurs de transcription spécifiques GATA1, GATA2 et KLF1 se chevauchaient avec une région enrichie en 5-hmC (98). Des expériences complémentaires effectuées sur le groupement de gènes de l'hémoglobine (« HB cluster genes ») durant la différenciation ont pu révéler qu'absolument chaque pic de présence des trois facteurs de transcription corrélait avec une région enrichie en 5-hmC, aussi enrichie en marques épigénétiques activatrices (Figure 12).

Cette marque caractéristique de la déméthylation active possède une activité biologique non négligeable, notamment dans les cellules souches embryonnaires et les progéniteurs érythroïdes dans lesquels elle participe activement à la régulation transcriptionnelle des gènes responsables de la pluripotence et de la différenciation, respectivement (103).

La perte de fonction des protéines TET est signe de mauvais pronostic puisque retrouvée fréquemment dans les dysplasies d'ordre myéloïde. Selon les études cliniques, *TET2* serait muté chez 43 à 50% des patients atteints de leucémie myélo-monocytaire chronique (104, 105) contre 13.2 à 27% de leucémies myéloïdes aiguës (106, 107). L'implication d'une mutation perte de fonction sur *TET2* (*TET2*mut) dans les leucémies myéloïdes aiguës reste encore quelque peu floue, mais il semblerait que cette mutation aggrave la maladie si elle est couplée à celle du gène *NPM1* ou *CEBPA* (106, 108). Les patients atteints de leucémie myélo-monocytaire chronique sont très fréquemment porteurs d'une mutation sur leur gène *ASXL1* (47%) (105). Etre diagnostiqué avec *TET2*mut peut être un bon ou mauvais pronostic, tout

dépendant des autres mutations présentes (fréquemment deux ou trois chez ces patients). Une mutation *TET2* couplée à celle d'*ASXL1* n'est pas un bon pronostic alors que si aucune mutation n'est détectée sur *ASXL1*, le diagnostic de *TET2*mut semble améliorer la survie du patient (105).

La méthylation est un événement biologique très important dans la régulation des gènes et sa dérégulation est souvent associée au développement tumoral. La méthylation est un processus réversible et la déméthylation d'une cytosine se produit de façon passive si aucun facteur ne vient la maintenir lors des divisions cellulaires. Toutefois, cette déméthylation peut être produite de façon beaucoup plus rapide si nécessaire. C'est le cas du développement embryonnaire pour lequel la régulation active/répressive de certains gènes nécessite d'être modifiée rapidement. Les enzymes TET, responsables de cette déméthylation intermédiaire qui produit l'hydroxyméthylation, sont notamment retrouvées en association avec le PRC2 sur des gènes bivalents dans les cellules souches embryonnaires. Ces gènes sont dans un état de pause transcriptionnelle et sont caractérisés par la présence de H3K4me3/H3K27me3. Cet état est levé lorsqu'un signal développemental vient initier la transcription de ces gènes (109, 110).

Dans cette deuxième partie, nous avons axé nos recherches sur l'implication du facteur IKAROS dans ce type de régulation. IKAROS est important dans le recrutement du complexe NuRD aux gènes activés par la voie NOTCH et semble se servir du NuRD pour maintenir les gènes en pause dans l'attente d'une activation physiologique appropriée. De façon intéressante, contrairement à MBD2 qui interagit préférentiellement avec des cytosines méthylées (111), MBD3 (qui est la sous-unité alternative de MBD2 dans le complexe NuRD) interagirait plutôt avec les cytosines hydroxyméthylées (112). Dans les cellules souches

embryonnaires, MBD3 colocalise avec TET1 et sa perte affecte le niveau global de 5-hmC (112). En regroupant ces prérequis, nous nous sommes interrogés sur l'éventualité qu'IKAROS puisse être un élément important dans cette relation MBD3-5hmC dans les cellules hématopoïétiques.

3.4. Résultats

3.4.1. IKAROS interagit avec la protéine TET1 dans les cellules érythroïdes des foies fœtaux murins et dans les cellules Mouse Erythro-Leukemia (MEL).

Pour vérifier s'il existe une interaction entre IKAROS et TET1, nous avons réalisé une IP de la protéine IKAROS dans les cellules de foies fœtaux (E14.5) murins Ik^{WT}. Après révélation par Western Blot (immuno-buvardage de type Western), nous avons pu observer la co-immunoprécipitation de ces deux protéines (Figure 13). Etant donné que ces résultats proviennent de cellules primaires, nous avons voulu confirmer ce résultat dans la lignée cellulaire murine MEL. L'IP, cette fois-ci réalisée sur la protéine TET1, a permis de confirmer l'interaction réciproque avec IKAROS. Il est à noter que, par la suite, nous utiliserons le terme « interaction » lorsque nous introduirons les données d'immunoprécipitation de protéines, bien que nous ne sachions pas si les interactions sont directes ou si elles requièrent d'autres partenaires protéiques pour se retrouver ensemble lors de la co-immunoprécipitation.

Pour vérifier si cette interaction s'étend aux autres protéines TET, nous avons réalisé une IP avec la protéine TET2. Parmi les trois protéines TET, celle-ci est la protéine TET la mieux caractérisée cliniquement dans les tissus tumoraux (104-107). Aucune interaction claire et détectable ne semble exister entre IKAROS et TET2, privilégiant alors TET1 comme potentiel partenaire de régulation avec IKAROS dans les cellules érythroïdes. Étant donné que le

facteur IKAROS recrute la sous-unité CHD4 du complexe NuRD à la chromatine, il pourrait aussi y amener une autre sous-unité du NuRD, MBD3, en même temps que la protéine TET1. En effet, puisque la sous-unité MBD3 interagit avec les cytosines hydroxyméthylées (112), un lien biologique pourrait exister entre IKAROS et la protéine TET1. Ceci permettrait de coordonner le recrutement des facteurs favorables à la répression/activation des gènes suite à l'hydroxyméthylation des cytosines.

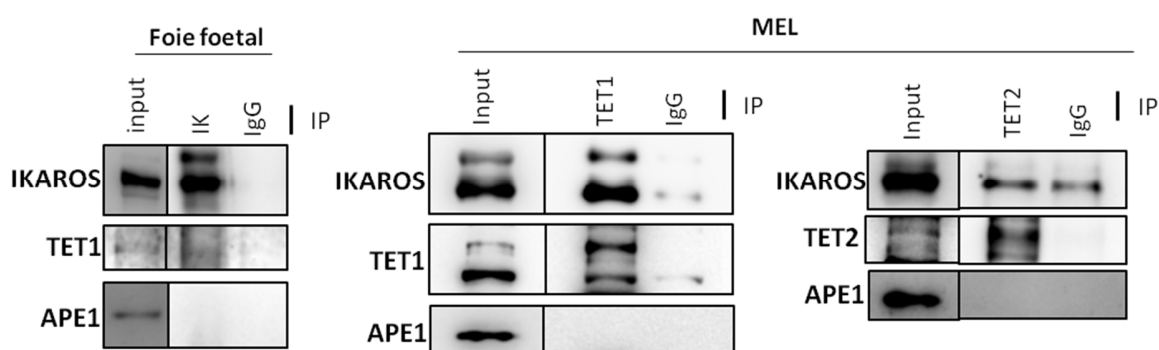


Figure 13. Immunoprécipitation des protéines TET1, TET2 et IKAROS dans les cellules de la lignée murine MEL et des protéines TET1 et IKAROS dans les cellules de foies fœtaux. L'immunoprécipitation (IP) de la protéine IKAROS (Ac anti-IKAROS) a été réalisée à partir de cellules de foies fœtaux. Les IP de la protéine TET1 (Ac Anti-TET1) et TET2 (Ac anti-TET2) ont été réalisées sur du matériel de lignée murine MEL. Chaque IP a été réalisée en parallèle avec l'immunoglobuline de type « rabbit » comme contrôle isotypique. La protéine APE1 (Ac anti-APE1) a servi de contrôle négatif pour les trois expériences d'IP.

Un modèle envisageable serait donc qu'IKAROS faciliterait le recrutement de NuRD et de TET1 aux gènes cibles, entraînant alors la formation de 5-hmC qui, avec la 5-fC, est un substrat préférentiel de la sous-unité MBD3 du NuRD (113). L'interaction d'IKAROS avec le NuRD pourrait ici permettre de renforcer la stabilité du NuRD sur les régions hydroxyméthylées.

Pour vérifier si le facteur IKAROS peut recruter la protéine TET1 à la chromatine, nous avons orienté l'étude sur les gènes cibles de la voie NOTCH : *Hes1*, *Hey2* et *HeyL* (114, 115) puisque IKAROS est connu comme un régulateur important des gènes de la voie NOTCH dans les cellules hématopoïétiques (66, 69).

3.4.2. IKAROS module les gènes *Hes1*, *Hey2* et *HeyL* de façon directe dans les cellules érythroïdes.

Par expérience de RT-qPCR sur les cellules érythroïdes de foies fœtaux Ik^{WT} et Ik^{NULL}, nous avons vérifié l'implication du facteur IKAROS dans la régulation des gènes *Hes1*, *Hey2* et *HeyL*.

Comme préalablement démontrée dans le laboratoire (67), l'absence d'IKAROS entraîne bien une augmentation de l'expression du gène *Hes1* dans les cellules érythroïdes (Figure 14). L'absence d'IKAROS sur les gènes *Hey2* et *HeyL* entraîne quant à elle, leur répression. Nous avons aussi reconfirmé dans notre modèle la présence d'IKAROS au promoteur du gène *Hes1* par expérience de ChIP (Figure 15). IKAROS est aussi présent sur le TSS des gènes *Hey2* et *HeyL* et sa présence diminue dans les cellules Ik^{NULL} (Figure 15). IKAROS peut donc influencer de façon directe les gènes *Hes1*, *Hey2* et *HeyL* dans les cellules érythroïdes de foies fœtaux murins.

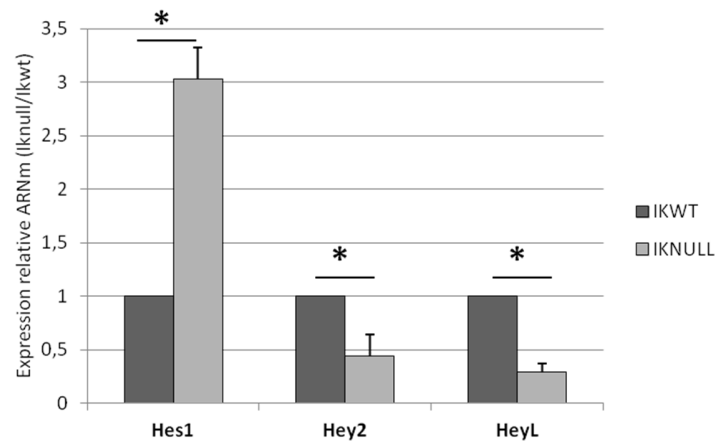


Figure 14. Expression des gènes *Hes1*, *Hey2* et *HeyL* dans les cellules érythroïdes de foies fœtaux murins Ik^{WT} et Ik^{NULL} . L'expression des gènes *Hes1*, *Hey2* et *HeyL* a été obtenue par RT-qPCR en utilisant le gène *Actine* comme contrôle interne. L'expression dans les cellules érythroïdes de foies fœtaux Ik^{NULL} a été calculée selon un ratio dans lequel l'expression dans les cellules érythroïdes de foies fœtaux Ik^{WT} a été ramenée à 1. n=3, p-value<0.05.

3.4.3. IKAROS régule le recrutement de la protéine TET1 et la présence de 5-hmC à la chromatine de *Hes1*, *Hey2* et *HeyL*.

Nous avons utilisé la technique de ChIP afin de vérifier si IKAROS peut recruter la protéine TET1 sur les gènes *Hes1*, *Hey2* et *HeyL*. Pour cela, l'enrichissement de la protéine TET1 a été déterminé sur des régions riches en CpG (promoteurs de *Hes1*, *Hey2* et *HeyL*) dans les cellules érythroïdes de foies fœtaux Ik^{NULL} par rapport à celles de foies fœtaux Ik^{WT} . Dans les foies fœtaux Ik^{WT} , la protéine TET1 se retrouve largement présente sur les régions CpG des trois gènes avec des valeurs d'enrichissement s'élevant à 8 (*Hes1*/*HeyL*) et 4 (*Hey2*) par rapport au contrôle interne négatif, la région du promoteur du gène *Thp1* (Figure 16). Quand IKAROS

n'est plus exprimé (Ik^{NULL}) et donc absent de ces régions CpG (Figure 16), la présence de TET1 chute à un enrichissement de 2 pour chacun des gènes (Figure 16). Ces résultats démontrent une association entre l'absence d'IKAROS et la perte de la protéine TET1 sur les régions CpG des gènes cibles de la voie NOTCH *Hes1*, *Hey2* et *HeyL*.

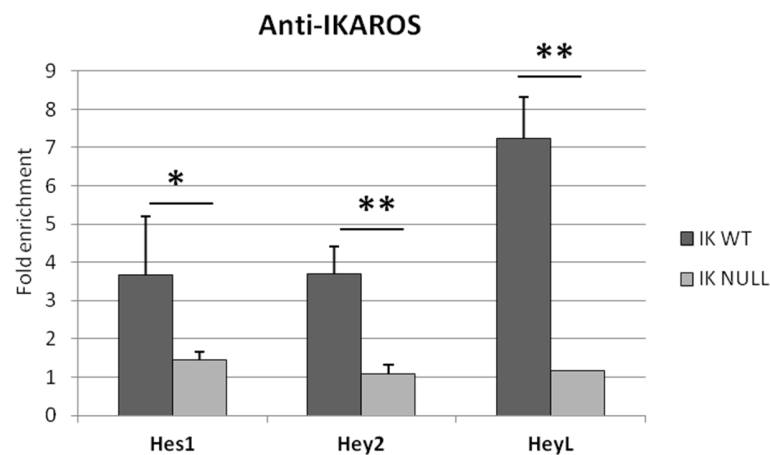


Figure 15. Enrichissement relatif du facteur IKAROS sur la région CpG des gènes *Hes1*, *Hey2* et *HeyL* dans les cellules érythroïdes de foies fœtaux Ik^{WT} et Ik^{NULL}. Les expériences de ChIP ont été réalisées sur des cellules érythroïdes de foies fœtaux Ik^{WT} et Ik^{NULL} avec l'Ac anti-IKAROS. Les résultats d'enrichissement ont été obtenus suite à l'analyse par qPCR de la région promotrice des gènes *Hes1*, *Hey2* et *HeyL*. Le contrôle interne utilisé est le promoteur du gène *Thp1*. Les valeurs de l'axe vertical représentent l'enrichissement relatif par rapport au contrôle interne. n=2 pour *Hey2* et *HeyL* dans Ik^{WT} ; n=3 pour toutes les autres valeurs. *: p-value≤0.06. **: p-value<0.05.

Dans les cellules érythroïdes murines, IKAROS semble donc influencer le recrutement du facteur TET1 à la chromatine de certains gènes. Étant donné qu'il existe trois protéines TET,

nous nous sommes questionnés à savoir si dans notre modèle la perte du facteur IKAROS pouvait affecter les niveaux globaux de 5-hmC. Nous avons donc vérifié par expérience de ChIP spécifique à la marque 5-hmC quelles étaient les conséquences d'une perte d'IKAROS sur les régions CpG des trois gènes cibles de la voie NOTCH.

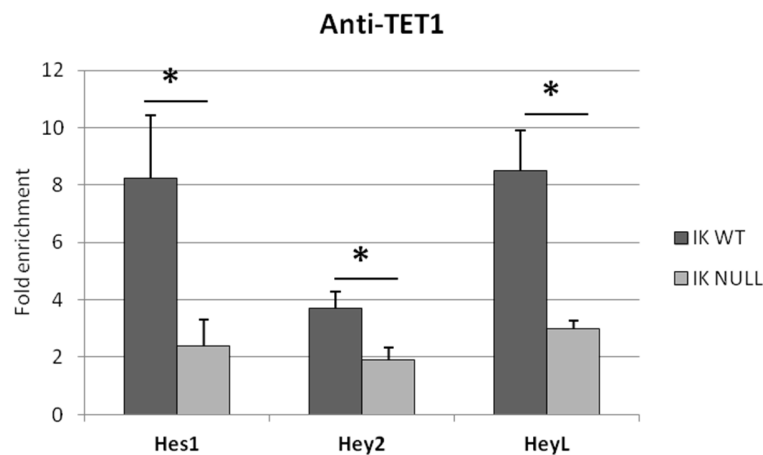


Figure 16. Enrichissement relatif du facteur TET1 sur une région riche en CpG des gènes *Hes1*, *Hey2* et *HeyL* dans les cellules érythroïdes de foies fœtaux *Ik*^{WT} et *Ik*^{NULL}. Les expériences de ChIP ont été réalisées sur des cellules érythroïdes de foies fœtaux *Ik*^{WT} et *Ik*^{NULL} avec l'Ac anti-TET1. Les résultats d'enrichissement ont été obtenus suite à l'analyse par qPCR sur la région promotrice des gènes *Hes1*, *Hey2* et *HeyL*. Le contrôle interne utilisé est le promoteur du gène *Thp1*. Les valeurs de l'axe vertical représentent l'enrichissement relatif par rapport au contrôle interne. n=3 avec p-value<0.05.

De façon intéressante, l'enrichissement de la marque 5-hmC chute significativement suite à la perte d'IKAROS (Figure 17). Aucune redondance ne semble donc être détectée pour la fonction d'IKAROS qui facilite le recrutement de l'activité déméthylase de TET (TET1) à ces

gènes. Cependant, étant donné que nous ne possédons pas de donnée concernant l'enrichissement des facteurs TET2 et TET3 sur ces régions CpG, nous ne pouvons exclure que TET2 et TET3 puissent aussi être recrutés à ces gènes et qu'IKAROS soit en mesure d'influencer directement ou indirectement leur recrutement à la chromatine et dès lors réguler l'ensemble du patron d'hydroxyméthylation de ces trois gènes.

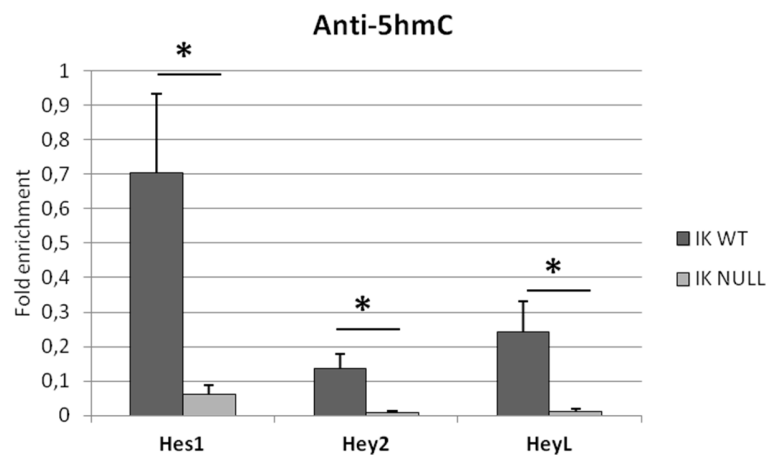


Figure 17. Enrichissement relatif de la marque hydroxyméthylcytosine (5-hmC) sur la région CpG des gènes *Hes1*, *Hey2* et *HeyL* dans les cellules érythroïdes de foies fœtaux *Ik^{WT}* et *Ik^{NULL}*. Les expériences de ChIP ont été réalisées sur des cellules érythroïdes de foies fœtaux *Ik^{WT}* et *Ik^{NULL}* avec l'Ac anti-5hmC. Les résultats d'enrichissement ont été obtenus suite à l'analyse par qPCR sur la région promotrice des gènes *Hes1*, *Hey2* et *HeyL*. Les valeurs de l'axe vertical représentent l'enrichissement relatif en pourcentage de l'input correspondant. $n \geq 3$ avec $p\text{-value} < 0.05$.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'IKAROS est capable de recruter TET1 sur certains gènes cibles de NOTCH et que cette relation entre IKAROS et TET1 semble avoir une valeur

biologique significative. Cette relation décrit IKAROS comme un facteur important dans le processus de déméthylation de l'ADN se produisant, tout au moins, à certains gènes de la voie NOTCH dans les cellules érythroïdes. En effet, son absence entraîne une diminution significative de l'oxydation des cytosines méthylées. L'existence d'une interaction IKAROS-NuRD-TET1 pourrait définir l'hydroxyméthylation comme une marque importante dans la régulation transcriptionnelle de certains gènes cibles de NOTCH, qu'ils soient réprimés ou activés par IKAROS. En effet, le complexe NuRD (grâce à la sous-unité MBD3) interagit avec TET1 et semble être important pour le dépôt de la marque 5-hmC à la chromatine des cellules souches embryonnaire (112). De ce fait, le complexe NuRD pourrait, en partenariat avec le facteur IKAROS qui se lie aussi à la protéine TET1, contribuer au dépôt et maintien de cette marque, dans un contexte de régulation génique.

L'hydroxyméthylation est une marque fréquente de gènes en pause transcriptionnelle et caractérisés par une chromatine bivalente (116, 117). TET1 est notamment retrouvé sur des gènes de développement dans les cellules souches embryonnaires, et son association avec les modifications d'histone permet de faciliter l'activation ou la répression génique durant la différenciation cellulaire. L'absence des protéines TET induit la répression des gènes développementaux due à l'hyperméthylation de l'ADN. Le dépôt correct des protéines TET sur ces gènes est donc requis pour accéder à une expression adéquate en fonction des modifications d'histone présentes en association avec TET : gène activé si présence de 5-hmC avec H3K4me3, gène 'en pause' si présence de 5-hmC avec H3K4me3/H3K27me3 ou bien réprimé si présence de 5-hmC avec H3K27me3 (117). Dans ce sens, une étude récente a pu attribuer une fonction complémentaire à l'hydroxyméthylation présente sur ces gènes (116). En effet, la perte d'hydroxyméthylation (par invalidation des protéines TET) entraîne une

hyperméthylation *de novo* des promoteurs de type ‘bivalent’ et empêche les cellules souches embryonnaires de se différencier. IKAROS serait donc un facteur important dans la mise en place des différents éléments transcriptionnels à la chromatine des gènes étudiés, dont le dépôt d’hydroxyméthylation semble être un prérequis quant aux décisions transcriptionnelles subséquentes. De ce fait, en absence d’IKAROS, l’expression de certains gènes de la voie NOTCH pourrait être affectée en cas d’activation de la signalisation puisque la chromatine, ainsi que la régulation épigénétique impliquant la méthylation de l’ADN, n’auraient pas été préalablement préparée.

PARTIE IV : Discussion et Conclusion

4.1. Discussion

IKAROS est un facteur de transcription majeur dans l'hématopoïèse, notamment par sa capacité à recruter à la chromatine de nombreux partenaires décisifs dans le renouvellement cellulaire et l'engagement vers des lignages spécifiques. De la cellule souche hématopoïétique à la cellule lymphoïde, en passant par la cellule érythroïde ou encore les granulocytes, IKAROS exerce son activité sur un grand nombre de décisions hématopoïétiques (67, 118-120). Beaucoup d'études relatent l'importance du facteur IKAROS dans le développement lymphoïde au détriment de l'engagement érythroïde car moins exprimé dans ces cellules (73). Cependant, une expression moins importante ne signifie pas qu'aucune activité n'est à considérer et qu'il n'a pas sa place dans ce lignage. En effet, l'absence de ce facteur chamboule l'orchestration normalement mise en place pour amener une cellule souche hématopoïétique à se différencier en érythrocyte anucléé circulant dans le sang, pour transporter l'oxygène aux organes (67, 121). IKAROS est notamment important pour la régulation des globines et l'expression de la β -globine adulte au moment opportun, étant responsable du recrutement adéquat des complexes remodeleurs NuRD pour éteindre l'expression de la globine fœtale et BAF pour permuter vers une expression adulte (26, 122, 123). Son mode d'action rend dès lors le contrôle de l'expression plutôt flexible en fonction des signaux de développement.

Les études réalisées sur les cellules lymphoïdes rapportent des faits assez clairs sur la relation qui existe entre IKAROS et la voie de signalisation NOTCH (64-66). Il est donc bien établi aujourd'hui qu'IKAROS régule les gènes cibles de cette voie dans les cellules lymphoïdes. Notre étude apporte une lumière supplémentaire sur la mécanistique qu'utilise IKAROS pour

réguler ces gènes cibles dans le développement érythroïde. Les études réalisées auparavant ont exclusivement décrit IKAROS comme un facteur s'opposant à l'action de NOTCH sur ses gènes. En plus de confirmer cette tendance dans notre système érythroïde, nous démontrons pour la première fois qu'IKAROS peut aussi aider et amplifier la réponse NOTCH dans l'activation de ses gènes cibles. IKAROS représenterait une unité de base dans la régulation des gènes cibles de la voie NOTCH en organisant une structure de la chromatine et un état de pause transcriptionnelle, permettant l'activation ou la répression de gènes cibles en fonction des facteurs décisionnaires (notamment signaux développementaux). Nous discuterons de l'étude et des résultats associés dans ce chapitre.

4.1.1. Modèle érythroïde utilisé

4.1.1.1. Souris

Le modèle murin utilisé pour les expériences offre de multiples avantages. Premièrement, l'usage de cellules primaires nous fournit une meilleure fidélité et fiabilité de ce qui peut se passer *in vivo*. De plus, la littérature couvrant les mécanismes biologiques propres au développement érythroïde relate majoritairement des expériences réalisées à l'aide de modèles murins. L'utilisation du foie fœtal au 14ème jour embryonnaire représente un choix judicieux puisque la globine des cellules érythroïdes est à ce stade adulte. Étant donné que le développement des cellules y est définitif, l'utilisation des cellules provenant du foie fœtal nous donne une bonne indication de ce qui se passerait *in vivo* dans la moelle osseuse après la naissance.

Deuxièmement, l'utilisation du modèle murin permet au manipulateur d'invalider ou d'amplifier l'expression d'un ou plusieurs gènes et ce, de façon conditionnelle ou constitutive.

Nous avons pu ainsi utiliser une lignée invalidée de façon constitutive pour le gène *Ikzf1* (codant la protéine IKAROS) (73) et dont l'expression protéique est indétectable dans les cellules. Étant donné qu'une telle invalidation entraîne des anomalies pouvant mener à la mort du souriceau après la naissance, l'utilisation des cellules au stade embryonnaire est donc favorisée.

Chaque femelle accouplée donne naissance à environ neuf à quatorze bébés, pouvant chacun appartenir à un des trois génotypes différents: sauvage (WT), muté (NULL) ou hétérozygote (HTZ). Le modèle murin permet de maximiser les expériences puisque les embryons sont récupérés rapidement (14.5 jours après accouplement) et donnent, selon les portées, directement accès à plusieurs échantillons appartenant à chacun des génotypes.

Le modèle murin possède aussi ses limites puisqu'il est assez difficile d'invalider en même temps plusieurs gènes importants dans le développement sans devenir létal pour l'embryon. L'utilisation de siARN *ex vivo* ne permet pas non plus de passer au travers de cette limite puisque l'efficacité de transfection nucléaire est très faible dans les cellules primaires. Pour contourner cette limite, il est judicieux d'utiliser une lignée cellulaire qui offre une meilleure efficacité de transfection nucléaire.

4.1.1.2. Lignée de pro-érythroblastes G1E-ER4

La lignée cellulaire G1E-ER4 a été utilisée pour substituer notre modèle *in vivo* pour l'expérience de transfection nucléaire. En effet, l'efficacité de transfection nucléaire vérifiée à l'aide de GFP est excellente dans les G1E-ER4 et c'est pourquoi nous l'avons utilisée pour éteindre temporairement l'expression du gène *Trp53* dans nos essais. Pour aller au-delà de la limite biologique *in vivo* concernant la double invalidation de gènes importants dans le

développement, nous avons imité l'invalidation du gène *Ikzf1* de notre modèle *in vivo* en utilisant la méthode d'invalidation par shARN dans les G1E-ER4.

Nous avons aussi pu profiter de leur robustesse, plus importante que celle des cellules primaires, afin d'optimiser les essais de stress génotoxique.

D'un point de vue développemental, cette lignée offre l'avantage particulier de pouvoir se différencier grâce à la construction génétique conditionnelle qu'elle contient. En effet, sous l'action du Tamoxifène, l'accumulation nucléaire du facteur GATA-1 est induite, permettant la différenciation érythroïde des G1E-ER4 (124-126). Dans notre étude, nous avons utilisé majoritairement le modèle *in vivo* pour répondre à notre hypothèse. Dans la littérature, IKAROS a préalablement été décrit comme un facteur qui façonnerait l'expression des gènes cibles de la voie NOTCH en fonction des différents stades de différenciation lymphocytaire T. IKAROS aurait donc une activité dynamique au cours du développement. Dans notre modèle, nous avons pu utiliser les propriétés de la lignée G1E-ER4 afin d'étudier l'implication de la protéine TP53 dans le contrôle de la protéine P21^{WAF1/CIP1} dans les cellules érythroïdes différenciées. Cette lignée de pro-érythroblastes se différencie en érythrocytes grâce à l'accumulation au noyau de GATA-1 (124-126), responsable de la régulation de P21^{WAF1/CIP1} dans le développement des cellules érythroïdes (127). Dans notre modèle, P21^{WAF1/CIP1} semble être régulé par IKAROS de façon indépendante à la protéine TP53. Il serait donc intéressant de vérifier si, dans les cellules érythroïdes différenciées, IKAROS opère en collaboration avec GATA-1 pour réguler la protéine P21^{WAF1/CIP1}.

4.1.1.3. Lignée stromale OP9-DL1

Pour notre étude, le mode d'activation de la voie NOTCH dans les cellules de foie fœtal s'est porté sur le système OP9-DL1. Ces cellules sont modifiées génétiquement pour surexprimer le ligand Delta-Like 1 de la voie NOTCH et faciliter l'activation de cette voie dans la cellule voisine réceptrice. Il existe d'autres modes d'activation de NOTCH :

- par modification génétique induisant une activation conditionnelle ou constitutive (128);
- par ajout de substance chimique stimulatrice de la voie dans le milieu de culture (129).

L'utilisation du système OP9-DL1 nous a semblé être le choix le plus judicieux étant donné qu'il est relativement bien documenté dans la littérature (130-132) et qu'il évite toute manipulation additionnelle chez la souris. De plus, l'ajout d'une substance chimique dans le milieu de culture peut entraîner des effets non désirés sur les cellules et peut même avoir une action synergique ou antagoniste avec l'érythropoïétine qui est ajoutée dans le milieu pour orienter les cellules vers la voie érythroïde. La méthode de co-culture a donc l'avantage d'être rapide, temporaire et peu coûteuse. Ce modèle a aussi été validé au préalable par cytométrie en flux pour évaluer le pourcentage de cellules de foies fœtaux Ter119+ obtenu après 48 heures de co-culture sur OP9/OP9-DL1 (Figure S2). Le manipulateur doit cependant faire preuve de rigueur en récupérant les cellules de foies fœtaux en suspension afin d'éviter toute contamination provenant de cellules OP9 qui se seraient décollées.

4.1.2. Notion de plateforme de recrutement IKAROS-NuRD

Notre étude a permis de mieux comprendre le mode de fonctionnement d'IKAROS dans cette régulation et a permis de mettre en avant un rôle particulier pour le complexe NuRD. Qu'il

s'agisse d'activation ou de répression, nos résultats ont démontré que le complexe NuRD est partenaire du facteur IKAROS sur les mêmes régions régulatrices des gènes de la voie NOTCH. De ce fait, NuRD et IKAROS colocalisent aussi bien aux régions de gènes réprimés par IKAROS comme *Cdkn1a* et *Trp53*, qu'aux régions de gènes activés par IKAROS comme *Prdm16* et *Nrarp*. Dans le développement normal des cellules érythroïdes de foie fœtal, IKAROS contrôle l'expression physiologique de ces gènes appartenant à la voie NOTCH. Dans cette étude, nous avons démontré que l'absence d'IKAROS diminuait drastiquement la présence de CHD4 à la chromatine des gènes de NOTCH. Bien qu'il soit connu que CHD4 peut interagir avec les différents membres de la famille IKAROS (133), il semble que, d'après nos résultats, son recrutement soit essentiellement dû à IKAROS (IKZF1) dans les cellules érythroïdes. Précédemment, il a été rapporté que différents membres pouvant s'associer à CHD4 se lient à l'ADN sur des séquences ayant une forte homologie entre elles (134, 135). Julie L. Mitchell spécule alors en 2017 (136) que l'activité des membres de la famille pourrait se distinguer par leur capacité différentielle à lier des cofacteurs de transcription pour activer ou réprimer la transcription. Dans les cellules lymphoïdes, les niveaux d'expression des différents IKZF sont assez élevés (137) et la libération de séquences consensus due à l'absence d'IKAROS entraîne sûrement une liaison rapide des autres membres de la famille sur ces sites inoccupés. Cependant, la détection de niveaux plus faibles de ces protéines dans les cellules érythroïdes (137) tend à penser qu'il est plus difficile pour un membre de la famille de remplacer IKAROS (IKZF1) quand il est absent sur ses gènes cibles.

IKAROS pourrait donc avoir une capacité de liaison à CHD4 plus importante comparativement aux autres membres de sa famille de protéines dans les cellules érythroïdes. En son absence, le faible niveau d'expression des autres membres ne faciliterait donc pas leur

liaison à CDH4 sur les gènes cibles d'IKAROS dans les cellules érythroïdes. Cependant, il serait opportun de vérifier dans les cellules de foies fœtaux Ik^{null} l'enrichissement des autres membres de la famille sur les sites étudiés.

De façon évidente, il existe une importante relation entre IKAROS et CHD4 qui semble participer au contrôle précis de la voie NOTCH dans les cellules érythroïdes. Étant donné que leur colocalisation s'opère autant en condition de répression que d'activation de certains gènes cibles de NOTCH, il se pourrait qu'ils agissent comme une plateforme de recrutement pour préparer la chromatine. *A contrario*, le complexe remodeleur BAF (BRG1) semble lui être recruté plus particulièrement par le complexe NICD/RBPJ- κ lors de l'activation de NOTCH, et la présence d'IKAROS-NuRD pourrait empêcher son recrutement aux gènes qu'ils répriment. Il fut rapporté que, dans les cellules érythroïdes, IKAROS peut se trouver en interaction avec le complexe PYR qui est composé simultanément des sous-unités CHD4 du complexe NuRD et de sous-unités du complexe BAF (121).

Nous avons émis dans notre hypothèse d'étude qu'IKAROS pourrait favoriser le recrutement de sous-unités du NuRD et de BAF pour réguler les gènes ciblés par NOTCH. D'après nos résultats, il semble que ce soit plutôt le complexe actif RBPJ- κ /NICD qui favorise le recrutement d'un complexe remodeleur incluant BRG1 (BAF). Une étude réalisée par Yatim *et al* en 2012 (138) vient soutenir cette observation puisqu'ils ont identifié le complexe PBAF (incluant BRG1), mais aussi le facteur LSD1, en interaction avec le complexe actif RBPJ- κ /NICD/MAML. LSD1 est en effet présent à la chromatine aux côtés du complexe NOTCH répresseur mais reste présent dans le complexe même après activation de la signalisation. Les auteurs décrivent LSD1 comme un facteur requis dans la répression mais aussi dans

l'activation des gènes cibles de NOTCH et qui procède en changeant de cible/substrat à déméthyliser. Il agit ainsi en déméthylant la marque H3K4me1/me2 aux côtés de ses co-répresseurs et en déméthylant H3K9me1/me2 quand il est en présence du complexe actif RBPJ- κ /NICD/MAML. LSD1 fait aussi partie du complexe NuRD (139) et IKAROS/NuRD pourrait faciliter son recrutement aux gènes cibles de NOTCH. Le type d'activité (répressive ou activatrice) de LSD1 pourrait donc dépendre de la présence de IKAROS/NuRD qui se servirait de ces deux facettes pour faciliter la répression/pause transcriptionnelle (aux gènes à réprimer comme *Cdkn1a*) ou bien l'élongation productive (aux gènes à activer comme *Prdm16*) quand NOTCH est activé.

La régulation des gènes ciblés par NOTCH semble donc être contrôlée par des complexes différents en fonction de la présence d'IKAROS et/ou RBPJ- κ /NICD à la chromatine. D'ailleurs, nous pouvons remarquer dans les résultats présentés à la figure 17 que l'activité DOT1L, requise pour la di- et tri-méthylation de H3K79, n'est pas utilisée pour favoriser l'élongation lorsque IKAROS est présent sur ces gènes. Cependant, l'activité DOT1L est présente quand IKAROS est absent et que NOTCH devient alors le régulateur principal sur ces gènes. De façon intéressante, l'activité DOT1L est particulièrement associée aux gènes ayant un fort niveau d'expression transcriptionnelle (140). Dans notre étude, les gènes ciblés par NOTCH ont une expression basale et la présence de IKAROS-NuRD suffit à induire une élongation du transcrit. Cette élongation, qui se fait sans DOT1L, est rendue possible par le recrutement du complexe P-TEFb à la chromatine et fort probablement grâce à la phosphatase PP1 α (qui vient activer P-TEFb) qui est en interaction avec IKAROS (141). IKAROS-NuRD semblent donc protéger les gènes *Trp53* et *Cdkn1a* d'une surexpression par DOT1L (142) en

imposant un état de chromatine bivalente qui résulte en une expression transcriptionnelle de base, retrouvée aussi lors de pauses transcriptionnelles.

4.1.3. IKAROS-NuRD dans un contexte de chromatine bivalente

La fonction d'IKAROS, couplée à celle du NuRD, semble s'inscrire dans un contexte de bivalence de la chromatine dans nos cellules érythroïdes. La co-présence de H3K4me3 et H3K27me3 est caractéristique d'une chromatine bivalente et retrouvée typiquement sur des gènes de développement (facteurs de transcription spécifiques, facteurs du cycle cellulaire etc.), dont leur expression fluctue en fonction du lignage et du stade de différenciation cellulaire ((143-146)). Un gène bivalent est exprimé à de bas niveaux, mais 'prêt' (poised) pour être rapidement induit ou réprimé plus tard dans la différenciation (143-146). Le gène *Cdkn1a* représente l'un d'entre eux puisque son niveau d'ARNm (et son niveau protéique) augmente significativement lors de la différenciation des pro-érythroblastes G1E-ER4, induite par Tamoxifène (126). Le même phénomène est observé lors de la différenciation des MEL (cellules « Mouse ErythroLeukemia ») (147). Dans notre modèle, le foie fœtal est majoritairement composé de précurseurs érythroïdes et l'expression de *Cdkn1a* doit donc être maintenue dans un état 'prêt' en attendant son activation rapide lors de la différenciation érythroïde. D'après nos résultats, la perte de fonction d'IKAROS dans les cellules de foie fœtal entraîne une augmentation du niveau d'expression de *Cdkn1a*, qui, couplée à une perte de H3K27me3, implique le complexe PRC2 dans cette perte de bivalence. Dans ces conditions, l'activation d'un signal développemental, comme la voie de signalisation NOTCH, amplifie la réponse du gène *Cdkn1a*, toujours associée à une perte de H3K27me3. Dans les thymocytes, IKAROS est responsable du recrutement du PRC2 sur plus de 500 gènes régulés

au cours du développement, incluant ceux qui sont normalement induits dans les cellules souches hématopoïétiques et ceux induits par la voie NOTCH (72). L'implication d'IKAROS dans son recrutement semble aussi se vérifier dans les K562, cellules leucémiques myélo-érythroïdes, par des expériences de ChIP SUZ12 (sous-unité du PRC2) et d'immunoprécipitation IKAROS-EZH2 (Annexe II).

De façon intéressante, dans des lignées murines de lymphome, NOTCH a aussi été déterminé comme un recruteur du PRC2 aux côtés de son complexe de co-répresseurs. Cependant, d'après nos résultats, la présence de H3K27me3 sur le gène *Cdkn1a* semble être plutôt reliée à la présence du facteur IKAROS à la chromatine (148). La présence d'ARN PolII (résultats non présentés), associée à la co-présence de H3K27me3 et H3K4me3 sur *Cdkn1a* confère un état de 'pause' à la chromatine mais permet tout de même au gène d'être transcrit à de bas niveaux (sur OP9-Ik^{WT} et OP9/DL1-Ik^{WT}). Si toutefois une activation anormale de NOTCH survenait au stade de précurseur érythroïde/pro-érythroblaste, l'expression de *Cdkn1a* serait tout de même tamponnée par l'activité d'IKAROS. Sous activation de NOTCH, la dysfonction d'IKAROS pourrait cependant entraîner un arrêt et une sortie précoce du cycle cellulaire, en plus d'affecter éventuellement la différenciation des cellules (127, 149). Le gène *Cdkn1a* est aussi considéré comme un gène bivalent dans les cellules souches embryonnaires humaines dans lesquelles il est éteint mais enrichi en marques répressive H3K27me3 et activatrice H3K4me (150). Dans ces mêmes cellules, la réduction de H3K27me3 entraîne l'augmentation de *Cdkn1a* comme observé dans nos résultats, et la différenciation des cellules comme observé dans la différenciation des pro-érythroblastes (G1E-ER4) et des MEL (126, 147).

Contrairement au gène *Cdkn1a*, les gènes *Prdm16* et *Nrarp* répondent à l'absence d'IKAROS par une diminution de la présence de H3K4me3 (H3K27me3 n'est pas influencé par IKAROS pour ces deux gènes). Cette marque est déposée par des méthyl-transférases d'histone retrouvées notamment dans les complexes SET1A/B et MLL1-5. De plus, puisqu'il est rapporté que PRDM16 pourrait aussi agir comme méthyltransférase de H3K4 (151), il serait intéressant de vérifier si l'induction de l'expression de *Prdm16* par IKAROS (signal qui est amplifié par NOTCH) n'induirait pas une augmentation de l'activité de méthylation de PRDM16 sur les résidus lysines cibles. Ceci pourrait alors impliquer un système d'autorégulation de PRDM16 dans lequel IKAROS serait directement enrôlé.

Au stade de précurseur, nous pourrions décrire *Prdm16* et *Nrarp* comme des gènes 'amorçés' (« primed ») et dont l'absence du facteur IKAROS rétablit une structure chromatinienne de type 'bivalent' et donc peu exprimé.

De façon intéressante, ce système de bivalence est utilisé par le complexe NuRD dans le développement des cellules souches hématopoïétiques. Dès 2008, Toshimi Yoshida et al. (152) attribuent un rôle important de la sous-unité Mi2 β (CHD4 du NuRD) dans le contrôle des gènes de développement dans les cellules souches hématopoïétiques (auto-renouvellement versus engagement). Ils décrivent Mi2 β comme un facteur requis pour l'expression de 356 gènes (et qui seront éteints plus tard dans le développement) et la répression de 347 gènes (lesquels seront surexprimés plus tard dans le développement) en décrivant ces gènes de type 'bivalent' comme 'amorçés' ou 'en pause', respectivement. Cette régulation épigénétique implique Mi2 β comme un régulateur direct dans l'amorçage du lignage des cellules souches hématopoïétiques et progéniteurs. La perte de fonction de Mi2 β dans la moelle osseuse murine

induit les mêmes dérégulations observées dans des foies fœtaux perte de fonction pour IKAROS : une accumulation des BFU-E et CFU-E, associée à une diminution des cellules différenciées, menant à une érythro-leucémie couplée à une anémie chez la souris (67). La similitude observée suite à la perte de fonction de chacun de ces facteurs (IKAROS et Mi2 β) souligne leur importance dans le développement des cellules érythroïdes. Nos résultats démontrent qu'IKAROS est indispensable au recrutement de Mi2 β (CHD4) sur les gènes étudiés, et mettent en avant un tout autre mécanisme dans lequel Mi2 β serait un facteur déterminant dans le mécanisme de bivalence, accordé au duo IKAROS/NuRD.

Un gène bivalent dépend de signaux développementaux qui viendront influencer son expression. Il existe deux groupes d'éléments importants dans la mise en place d'une chromatine bivalente (153, 154) :

- les éléments qui viennent organiser la structure bivalente (organisation de la chromatine plus ou moins ouverte, recrutement de facteurs agissant sur la méthylation de l'ADN, recrutement d'éléments du complexe de pré-initiation, etc.) de manière à répondre le plus rapidement possible à une transcription efficace du gène.
- les éléments qui déterminent l'activation ou la répression du gène, suivant le type cellulaire et le stade de différenciation (signaux développementaux divers).

IKAROS et NuRD sont impliqués indépendamment dans la formation du complexe de pré-initiation (133, 155) et nos résultats tendent à penser que la plateforme IKAROS-NuRD serait présente pour préparer la chromatine en recrutant les éléments nécessaires à l'organisation d'une chromatine bivalente.

4.1.4. IKAROS recrute TET1 sur des gènes cibles de la voie NOTCH

IKAROS est déjà établi comme un suppresseur du gène *Hes1* dans les cellules érythroïdes et opère avec le PRC2 en facilitant le recrutement de GATA-1 sur le gène (67). Dans notre étude, nous avons démontré pour la première fois qu'IKAROS est aussi capable de recruter le facteur TET1 à la chromatine de *Hes1* pour y déposer la marque 5-hmC. Nos résultats montrent qu'en absence d'IKAROS la diminution du dépôt de 5-hmC corrèle avec l'activation du gène *Hes1*. Cette marque d'oxydation de méthylation a été décrite le plus souvent comme présente sur les promoteurs de gènes actifs mais on la retrouve aussi sur des gènes ayant une chromatine bivalente et qui sont en pause transcriptionnelle. Nous avons donc vérifié la présence de méthylation sur le gène *Hes1* afin d'établir si, de façon relative, l'activité de TET1 est faible ou bien si son activité témoigne d'un processus de 'déméthylation active' essentiel dans la régulation de *Hes1*.

Sur le site ressource ENCODE, le meDIP-seq (séquençage de méthylation d'ADN) réalisé sur des cellules MEL révèle un enrichissement plus élevé au TTS (pour « Transcriptional Termination Site ») de *Hes1* comparativement au TSS où la méthylation est absente. D'après Su *et al* en 2014 (156), la méthylation se trouvant au TTS ne corrèle pas avec l'expression transcriptionnelle tandis que l'absence de méthylation au TSS corrèle avec une activation transcriptionnelle.

Dans notre modèle en condition normale, l'absence de méthylation sur le promoteur/TSS du gène *Hes1* pourrait être due à une activité de méthylation/déméthylation très dynamique et fournie par le complexe NuRD-IKAROS. En effet, la sous-unité CHD4 du complexe NuRD serait capable de recruter les méthyltransférases d'ADN (157) et pourrait ainsi favoriser la

méthylation des cytosines sur *Hes1* pour créer simultanément un substrat pour MBD2 puis la formation instantanée de 5-hmC par IKAROS/TET1.

Hes1 est un gène important dans le développement : son expression est faible dans les cellules hématopoïétiques progénitrices à E14.5 mais augmente légèrement en fin de maturation des cellules érythroïdes (67). Il est décrit dans la littérature que dans les cellules souches embryonnaires, TET1 peut s'associer avec PRC2 au TSS de gènes réprimés et bivalents (110), état caractéristique du dépôt de H3K4me3 et H3K27me3. Étant donné que l'expression de *Hes1* semble varier en fonction du stade de différenciation érythroïde, IKAROS pourrait donc servir à maintenir un état de pause/bivalence en favorisant la formation de H3K27me3, H3K4me3 (67) et de 5-hmC sur le gène *Hes1*.

L'analyse d'autres gènes ciblés par NOTCH montre que la marque 5-hmC semble avoir un effet biologique qui prévaut sur la 5-mC. En effet, d'après la même source de meDIP-seq que pour le gène *Hes1*, le TSS/promoteur des gènes *Hey2* et *HeyL* est bien enrichi par de la méthylation. Il semble donc que d'après nos résultats, la présence de 5-hmC colocalise avec la présence de 5-mC sur ces deux gènes. IKAROS interagit avec TET1 et l'absence d'IKAROS, qui entraîne une diminution de la 5-hmC au TSS/promoteur de ces gènes, suffit à faire diminuer l'expression des transcrits de *Hey2* et *HeyL* qui devrait être aussi associée à une augmentation de 5-mC. En effet, bien qu'il soit important de considérer que l'activité transcriptionnelle d'un gène dépend de son état de méthylation global (enhancer/promoteur/TSS/ORF), la fluctuation de la marque 5-hmC à des CpG spécifiques sur le TSS/promoteur semble avoir un effet biologique prédominant sur la 5-mC et, renforcée par

l'activité d'IKAROS, sert possiblement de site de liaison pour différents facteurs de transcription et/ou complexes enzymatiques responsables des décisions transcriptionnelles.

TET1 a préalablement été retrouvé en interaction avec plusieurs facteurs capables de le recruter à la chromatine. Dans les cellules souches embryonnaires murines, il peut notamment être recruté par le PRC2 dans un contexte de bivalence/pause, mais aussi par la protéine LIN28 et SIN3A dans un contexte d'activation transcriptionnelle (110, 158, 159). Nos résultats démontrent pour la première fois que le facteur IKAROS est impliqué dans le recrutement de TET1 dans les cellules érythroïdes et qu'il peut influencer directement l'activité de déméthylation de l'ADN de *Hes1*, *HeyL* et *Hey2*. Il serait intéressant d'analyser cette activité sur l'ensemble des gènes cibles de NOTCH et d'IKAROS à l'échelle du génome en employant la méthode du hMeDIP-seq sur des cellules de foies fœtaux Ter119+ Ik^{WT} et Ik^{NULL}, après activation de la voie NOTCH. Ces analyses devront être accompagnées d'un MeDIP-seq permettant de fournir les informations nécessaires sur l'état de méthylation global du génome et d'en savoir plus sur la dynamique méthylation/déméthylation des gènes.

La notion de 'plateforme' concernant IKAROS et NuRD pourrait donc avoir un rôle dans la régulation transcriptionnelle liée au dépôt de 5-hmC. La sous-unité MBD3 connue pour interagir avec TET1 et 5-hmC (112) pourrait servir à renforcer le maintien de cette marque dans l'activation ou la répression/pause transcriptionnelle. Bien qu'IKAROS interagisse avec TET1 et que son absence entraîne une réponse biologique, il serait opportun de compléter cette étude en invalidant MBD3 pour vérifier si IKAROS est capable d'agir seul ou s'il nécessite la coopération avec son partenaire NuRD pour affecter les niveaux de 5-hmC.

4.1.5. Effets biologiques dus à l'activation ectopique de NOTCH en absence d'IKAROS

L'analyse DAVID réalisée sur le séquençage d'ARN des cellules Ter119+ Ik^{WT} et Ik^{NULL} sur OP9 et OP9-DL1 nous a permis d'obtenir de nombreux renseignements quant aux potentielles conséquences biologiques de telles mutations. En effet, comme nous avons pu le décrire plus tôt dans l'introduction, IKAROS est un facteur important pour le développement et l'identité des cellules érythroïdes (67, 122). NOTCH est lui plutôt décrit comme un répresseur du lignage (160). La dérégulation de ces deux facteurs suppose donc que la production de cellules érythroïdes fonctionnelles est particulièrement chamboulée.

L'analyse comparative des fonctions associées à chacun des gènes du module 1 révèle que la mutation seule d'IKAROS entraîne des dérèglements sur l'ensemble des fonctions pouvant favoriser le développement d'une tumeur. Quand on compare les fonctions dérégées quand NOTCH s'active, on observe que plusieurs gènes s'ajoutent à la liste de certaines de ces fonctions alors que d'autres voient leur nombre de gènes stagner. Cette dernière catégorie de fonction correspond aux gènes qui sont seulement influencés par la mutation d'IKAROS. De cette façon, l'activation de NOTCH devrait favoriser la réponse immunitaire, la prolifération cellulaire et la transduction des signaux alors que la mutation seule d'IKAROS tend à favoriser plus particulièrement les capacités migratoires et la réponse médicamenteuse des tumeurs. Activer NOTCH dans les cellules mutées pour IKAROS tend à amplifier le caractère prolifératif de la tumeur ainsi que les réponses immunitaires qui peuvent renforcer l'anémie si elles sont d'origine inflammatoire.

Dans ce sens, nous avons donc étudié en détail l'implication de ces dérégulations en faisant ressortir l'indice oncogénique et suppresseur de tumeur de chacun des gènes du module 1 et du

modèle 2. Dans le modèle 1, le nombre de gènes au caractère oncogénique étant plus élevé que celui des suppresseurs de tumeurs, nous pourrions penser que cela confirme le caractère pro-tumoral de la double mutation. Il existe cependant un réel questionnement concernant l'effet biologique général du NOTCH actif dans les cellules érythroïdes IK^{NULL} puisque nos résultats démontrent que dans cette situation l'expression des suppresseurs de tumeurs P21^{WAF1/CIP1} et TP53 est amplifiée. À leurs côtés se placent aussi les gènes *Nr4a1*, *Zfp361l*, *Cd38* ou encore *Tgif1* qui agissent comme suppresseurs de tumeurs dans les leucémies myéloïdes aiguës et/ou chroniques (161-165).

On compte particulièrement sur l'importance des gènes *Cdkn1a* et *Trp53* dans l'inhibition du développement tumoral pour supporter l'hypothèse que l'activation de NOTCH pourrait avoir un effet anti-tumoral dans les cellules érythroïdes mutées pour IKAROS. En plus de leur rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire, nos premiers résultats concernant l'implication des facteurs P21^{WAF1/CIP1}/TP53 dans le processus de sénescence sont très révélateurs et nous poussent à croire que la double mutation appliquée au modèle érythroïde pourrait entraîner une sénescence des cellules (Annexe I). Des études démontrant les effets d'agents chimiques comme l'imatinib et l'hydroxyurée (166, 167) dans la lignée érythro-leucémique K562 ont permis de démontrer que la sénescence induite était notamment due à une augmentation des niveaux d'expression de P21^{WAF1/CIP1}/TP53. De plus, la diminution des facteurs pro-apoptotiques souvent observée dans les tumeurs tend à amplifier la sénescence dans les cellules K562 traitées à l'imatinib (167). Activer NOTCH permettrait ainsi de passer outre la réponse médicamenteuse et la diminution de la réponse apoptotique que la mutation d'IKAROS semble instaurer dans les cellules érythroïdes.

De plus, l'activation de NOTCH dans notre modèle Ik^{WT} (cellules non mutées) semble faire dévier le devenir de la cellule en faveur d'une différenciation mégacaryocytaire voire myéloïde. En effet, dans le modèle 2 (Figure 1B de l'article), la voie NOTCH induit une augmentation du facteur *Nrarp* spécialisé dans la différenciation mégacaryocytaire (168), mais aussi de *Spic* dont l'expression induit la différenciation myéloïde dans les MEP/CMP (169) et de *Padi-2* qui est exprimé particulièrement dans les monocytes (170) (gènes appartenant au modèle 2). De plus, l'augmentation d'expression du gène *Prdm16* réalisée dans la moelle osseuse de souris semble entraîner une anémie et favoriser le développement de leucémies myéloïdes aiguës (171). L'activation ectopique de la voie NOTCH dans les cellules normales ayant une protéine IKAROS fonctionnelle semble avoir un impact direct sur le développement érythroïde et pourrait être à l'origine d'anémie. Cette observation est confirmée par le comportement du gène *Cdkn1a* qui ne répond pas à l'activation de NOTCH dans nos cellules érythroïdes murines Ik^{WT}. Toutefois, l'inactivation du gène *Ikzf1* dans des cellules activées par NOTCH inverse cette tendance en réprimant les gènes *Prdm16*, *Nrarp*, *Spic*, *Padi-2* et en activant *Cdkn1a* pour favoriser la différenciation érythroïde. En effet, P21^{WAF1/CIP1} est un facteur hautement régulé par GATA-1 et est essentiel au développement normal des cellules érythroïdes (127). On comprend dès lors que des patients atteints d'anémie suite à une mutation dans leur gène *Ikzf1* pourraient potentiellement bénéficier de l'activation de la voie NOTCH. L'effet combiné de la perte d'IKAROS et l'activation de la voie NOTCH pourrait toutefois être très néfaste dans d'autres types de cellules hématopoïétiques et cet effet devrait donc être vérifié dans un premier temps. Pour ce faire, il faudrait développer une stratégie imitant notre modèle fœtal chez la souris adulte pour pouvoir étudier sur du long terme les conséquences sur le développement de tumeurs. Au laboratoire, les souris homozygotes pour

la mutation IKAROS développent un lymphome dans les deux mois qui suivent leur naissance (à forte pénétrance) et elles en meurent. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet d'une activation de la voie NOTCH dans ces souris afin d'observer si leur survie en est améliorée ou bien dégradée.

Il est important de considérer que l'aspect oncogénique de la voie NOTCH est notamment retrouvé chez l'humain dans les cellules T avec une activation ectopique caractéristique de plus de 60% de leucémie lymphoblastique aiguë (172, 173). De plus, activer cette voie dans des cellules lymphoïdes T Ik^{NULL} reviendrait à favoriser le développement tumoral en soutenant leur prolifération cellulaire (174). Cependant, l'aspect oncogénique de cette voie ne semble pas être étendue à tous les tissus puisque NOTCH n'est pas activé chez les patients atteints de leucémie myéloïde aiguë. C'est plutôt l'activation de cette voie dans des lignées tumorales de leucémie myéloïde aiguë qui tend à inhiber leur prolifération cellulaire et leur survie (175).

La surexpression des suppresseurs de tumeurs *Trp53* et *Cdkn1a* qui est due à l'absence du facteur IKAROS et l'activation de NOTCH pourrait donc être prometteuse dans les tissus tumoraux érythro-myéloïdes. Les effets biologiques de cette surexpression nécessitent d'être plus amplement étudiés puisqu'un certain nombre d'oncogènes sont eux aussi surexprimés. Il est donc certain qu'un bon nombre de paramètres seront à prendre en compte dans les futurs essais murins (effets biologiques oncogènes versus suppresseurs de tumeurs; prendre spécifiquement pour cible les cellules érythroïdes et non lymphoïdes) avant de pouvoir statuer sur l'implication potentiellement thérapeutique de cette voie dans les cellules érythroïdes Ik^{NULL}.

4.2. Conclusion

Dans cette étude, nous avons pu étendre les connaissances de la relation connue entre IKAROS et NOTCH aux cellules érythroïdes. La compréhension du mécanisme employé par IKAROS pour façonner l'expression des gènes ciblés par NOTCH nous a permis de découvrir (i) qu'il semble toujours agir aux côtés du complexe NuRD pour former une plateforme de recrutement et (ii) que cette relation pourrait être étendue au mécanisme d'hydroxyméthylation des gènes. Les travaux de Yildirim *et al* (112) décrivaient déjà en 2011 que la sous-unité MBD3 du complexe NuRD était un élément important dans le processus de déméthylation active par TET1 dans les cellules souches embryonnaires. Ils indiquaient de même que la protéine TET1 était requise pour le recrutement de MBD3 (NuRD). Les résultats obtenus dans notre étude apportent ici une lumière supplémentaire à la relation qui existe entre NuRD et TET1 puisque IKAROS semble être un élément adjacent, requis pour le recrutement de TET1 et de NuRD (probablement MBD3/NuRD) à la chromatine des gènes étudiés. Les auteurs de l'article de Yildirim *et al* (112) faisaient aussi un lien direct et complémentaire entre les sous-unités BRG1 et MBD3 dans la régulation de certains gènes des cellules souches embryonnaires, aussi retrouvée dans la régulation des gènes de β -globine par le facteur IKAROS. Cependant, aucun lien direct ni complémentaire n'a pu être confirmé pour les gènes ciblés par NOTCH dans les cellules érythroïdes et nous décrivons BRG1 comme un élément plutôt dépendant du complexe actif RBPJ- κ /NICD et non d'IKAROS. Toutefois, nous rejoignons avec conviction leurs résultats démontrant que MBD3, qui se lie à la 5-hmC, soit particulièrement enrichie sur les gènes possédant une chromatine bivalente. En effet, si IKAROS-NuRD agissent ensemble pour recruter TET1 et catalyser la formation de 5-hmC dans un contexte de bivalence/pause transcriptionnelle (H3K4me3/H3K27me3), nous

décrivons ainsi un nouveau mécanisme dans lequel la présence d'IKAROS sur les gènes cibles de NOTCH permet de préparer la chromatine adéquatement, en fonction des signaux cellulaires détectés. Cet état de bivalence permettrait une activation rapide des gènes cibles de la voie NOTCH et faciliterait l'adaptation biologique des cellules face à des stress qui requièrent une réponse rapide par activation de la voie NOTCH.

Cette étude décrit ainsi IKAROS comme un important facteur de transcription qui contrôle adéquatement la réponse physiologique à l'activation de NOTCH dans les cellules érythroïdes. Nous avons ainsi démontré qu'IKAROS utilise le complexe NuRD pour favoriser un état de chromatine bivalente associée à la pause de l'élongation transcriptionnelle des gènes cibles de NOTCH *Cdkn1a*, *Prdm16* et *Nrarp* et que la perte d'IKAROS chamboule de façon importante le transcriptome de ces cellules. Combiner cette mutation à l'activation de la voie NOTCH perturbe plus sévèrement le transcriptome des cellules érythroïdes. De plus, nous avons pu démontrer que l'activation de la voie NOTCH dans des cellules dépourvues d'une protéine IKAROS fonctionnelle entraînait la suractivation des gènes suppresseurs de tumeurs *Cdkn1a* et *Trp53* ainsi qu'une potentielle entrée en sénescence des cellules érythroïdes. Cette étude démontre pour la première fois qu'IKAROS peut aussi agir en synergie avec RBPJ- κ /NICD pour faciliter l'expression des gènes cibles de NOTCH. Nos résultats suggèrent donc qu'IKAROS possède avant tout un rôle de recruteur aux gènes de la voie NOTCH et c'est la combinaison des facteurs recrutés et des signaux détectés qui va aboutir à une activation ou répression transcriptionnelle. Pour cela, IKAROS agit aux côtés du complexe NuRD pour instaurer cette pause transcriptionnelle majoritairement associée au PRC2. Nous démontrons également une toute nouvelle dimension de régulation possible pour IKAROS puisque son

interaction approuvée avec TET1 semble être indispensable au dépôt de 5-hmC, marque souvent associée à de la bivalence/pause transcriptionnelle.

La régulation à plusieurs facettes qui est imposée par IKAROS permet donc de façonner l'expression des gènes en réponse à la voie NOTCH.

BIBLIOGRAPHIE

Note: La bibliographie ci-après fait référence à l'ensemble de la thèse, excepté pour la revue de littérature située dans l'Introduction ainsi que le chapitre 1 des Résultats (manuscrit d'article) qui détiennent chacun une bibliographie indépendante.

1. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008;132(4):631-44.
2. Galloway JL, Zon LI. Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr Top Dev Biol*. 2003;53:139-58.
3. Kawahara R, Shiozawa Y. Hematopoiesis☆. Reference Module in Biomedical Sciences: Elsevier; 2015.
4. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:759-806.
5. Olivier E, Bouhassira EE. Hematopoietic cells production from human embryonic stem cells2007. 153-64 p.
6. Nimmo RA, May GE, Enver T. Primed and ready: understanding lineage commitment through single cell analysis. *Trends Cell Biol*. 2015;25(8):459-67.
7. Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;112(6):2190-8.
8. Ogawa S. Genetics of MDS. *Blood*. 2019;133(10):1049-59.
9. Valent P, Busche G, Theurl I, Uras IZ, Germing U, Stauder R, et al. Normal and pathological erythropoiesis in adults: from gene regulation to targeted treatment concepts. *Haematologica*. 2018;103(10):1593-603.

10. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
11. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol*. 1999;10(12):1419-32.
12. Iwasaki H, Akashi K. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity*. 2007;26(6):726-40.
13. Wolff L, Humeniuk R. Concise review: erythroid versus myeloid lineage commitment: regulating the master regulators. *Stem Cells*. 2013;31(7):1237-44.
14. Nerlov C, Graf T. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev*. 1998;12(15):2403-12.
15. Krumsiek J, Marr C, Schroeder T, Theis FJ. Hierarchical differentiation of myeloid progenitors is encoded in the transcription factor network. *PLoS One*. 2011;6(8):e22649.
16. Zhang P, Behre G, Pan J, Iwama A, Wara-Aswapati N, Radomska HS, et al. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(15):8705-10.
17. Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, et al. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature*. 1991;349(6306):257-60.

18. Takahashi S, Onodera K, Motohashi H, Suwabe N, Hayashi N, Yanai N, et al. Arrest in primitive erythroid cell development caused by promoter-specific disruption of the GATA-1 gene. *J Biol Chem*. 1997;272(19):12611-5.
19. Ling KW, Ottersbach K, van Hamburg JP, Oziemlak A, Tsai FY, Orkin SH, et al. GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2004;200(7):871-82.
20. Huang Z, Dore LC, Li Z, Orkin SH, Feng G, Lin S, et al. GATA-2 reinforces megakaryocyte development in the absence of GATA-1. *Mol Cell Biol*. 2009;29(18):5168-80.
21. Iwasaki H, Mizuno S, Arinobu Y, Ozawa H, Mori Y, Shigematsu H, et al. The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. *Genes Dev*. 2006;20(21):3010-21.
22. Tsai FY, Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood*. 1997;89(10):3636-43.
23. Grass JA, Boyer ME, Pal S, Wu J, Weiss MJ, Bresnick EH. GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(15):8811-6.
24. Jing H, Vakoc CR, Ying L, Mandat S, Wang H, Zheng X, et al. Exchange of GATA factors mediates transitions in looped chromatin organization at a developmentally regulated gene locus. *Mol Cell*. 2008;29(2):232-42.

25. Chou ST, Khandros E, Bailey LC, Nichols KE, Vakoc CR, Yao Y, et al. Graded repression of PU.1/Sfpi1 gene transcription by GATA factors regulates hematopoietic cell fate. *Blood*. 2009;114(5):983-94.
26. Bottardi S, Ross J, Bourgoin V, Fotouhi-Ardakani N, Affar el B, Trudel M, et al. Ikaros and GATA-1 combinatorial effect is required for silencing of human gamma-globin genes. *Mol Cell Biol*. 2009;29(6):1526-37.
27. Dzierzak E, Philipsen S. Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(4):a011601-a.
28. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*. 1995;83(1):59-67.
29. Bratosin D, Mazurier J, Tissier JP, Estaquier J, Huart JJ, Ameisen JC, et al. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie*. 1998;80(2):173-95.
30. Smith LJ, Kahraman A, Thornton JM. Heme proteins--diversity in structural characteristics, function, and folding. *Proteins*. 2010;78(10):2349-68.
31. Courtois G, Vandekerckhove J, Dussiot M, Kersual J, Coulon s, Belaid-Choucair Z, et al. L'érythropoïèse tardive: une mort avortée ?2008.
32. Cantu I, Philipsen S. Flicking the switch: adult hemoglobin expression in erythroid cells derived from cord blood and human induced pluripotent stem cells. *Haematologica*. 2014;99(11):1647-9.
33. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*. 2005;352(10):1011-23.

34. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2017;376(16):1561-73.
35. Muncie HL, Jr., Campbell J. Alpha and beta thalassemia. *Am Fam Physician*. 2009;80(4):339-44.
36. Raj DS. Role of interleukin-6 in the anemia of chronic disease. *Semin Arthritis Rheum*. 2009;38(5):382-8.
37. De Maria R, Testa U, Luchetti L, Zeuner A, Stassi G, Pelosi E, et al. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood*. 1999;93(3):796-803.
38. Kheansaard W, Mas-Oo-di S, Nilganuwong S, Tanyong DI. Interferon-gamma induced nitric oxide-mediated apoptosis of anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2013;33(1):151-6.
39. McCranor BJ, Kim MJ, Cruz NM, Xue QL, Berger AE, Walston JD, et al. Interleukin-6 directly impairs the erythroid development of human TF-1 erythroleukemic cells. *Blood Cells Mol Dis*. 2014;52(2-3):126-33.
40. Costa E, Fernandes J, Ribeiro S, Sereno J, Garrido P, Rocha-Pereira P, et al. Aging is Associated with Impaired Renal Function, INF-gamma Induced Inflammation and with Alterations in Iron Regulatory Proteins Gene Expression. *Aging Dis*. 2014;5(6):356-65.
41. Chui DH, Waye JS. Hydrops fetalis caused by alpha-thalassemia: an emerging health care problem. *Blood*. 1998;91(7):2213-22.
42. Hartevelt CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:13.
43. Olivieri NF. The beta-thalassemias. *N Engl J Med*. 1999;341(2):99-109.

44. Origa R, Fiumana E, Gamberini MR, Armari S, Mottes M, Sangalli A, et al. Osteoporosis in beta-thalassemia: Clinical and genetic aspects. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1054:451-6.
45. Musallam KM, Taher AT, Cappellini MD, Sankaran VG. Clinical experience with fetal hemoglobin induction therapy in patients with beta-thalassemia. *Blood.* 2013;121(12):2199-212; quiz 372.
46. Rund D. Thalassemia 2016: Modern medicine battles an ancient disease. *Am J Hematol.* 2016;91(1):15-21.
47. Dussiot M, Maciel TT, Fricot A, Chartier C, Negre O, Veiga J, et al. An activin receptor IIA ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia. *Nat Med.* 2014;20(4):398-407.
48. Casu C, Ramos P, Melchiori L, Guy E, Rachmilewitz EA, Giardina P, et al. Potential therapeutic applications of Jak2 inhibitors in beta-thalassemia and sickle cell disease. *Am Soc Hematology*; 2011.
49. Casu C, Presti VL, Oikonomidou PR, Melchiori L, Abdulmalik O, Ramos P, et al. Short-term administration of JAK2 inhibitors reduces splenomegaly in mouse models of beta-thalassemia intermedia and major. *Haematologica.* 2018;103(2):e46-e9.
50. Dong C, Chadwick RS, Schechter AN. Influence of sickle hemoglobin polymerization and membrane properties on deformability of sickle erythrocytes in the microcirculation. *Biophys J.* 1992;63(3):774-83.
51. Eaton WA, Hofrichter J. Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. *Blood.* 1987;70(5):1245-66.

52. Silva DGH, Belini Junior E, de Almeida EA, Bonini-Domingos CR. Oxidative stress in sickle cell disease: an overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:1101-9.
53. Chirico EN, Pialoux V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life*. 2012;64(1):72-80.
54. Eaton WA, Hofrichter J, Ross PD. Editorial: Delay time of gelation: a possible determinant of clinical severity in sickle cell disease. *Blood*. 1976;47(4):621-7.
55. Zhang D, Xu C, Manwani D, Frenette PS. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood*. 2016;127(7):801-9.
56. Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP, Vercellotti GM. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood*. 2000;96(7):2451-9.
57. Hebbel RP, Boogaerts MA, Eaton JW, Steinberg MH. Erythrocyte adherence to endothelium in sickle-cell anemia. A possible determinant of disease severity. *N Engl J Med*. 1980;302(18):992-5.
58. Chen M, Qiu H, Lin X, Nam D, Ogbu-Nwobodo L, Archibald H, et al. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) in sickle cell disease vasculopathy. *Blood Cells Mol Dis*. 2016;60:44-8.
59. Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 1997;337(22):1584-90.
60. Hebbel RP. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest*. 1997;100(11 Suppl):S83-6.

61. Mendoza E, Gutgsell N, Temple JD, Issitt P. Monocyte phagocytic activity in sickle cell disease. *Acta Haematol.* 1991;85(4):199-201.
62. Dasgupta SK, Thiagarajan P. The role of lactadherin in the phagocytosis of phosphatidylserine-expressing sickle red blood cells by macrophages. *Haematologica.* 2005;90(9):1267-8.
63. Oder E, Safo MK, Abdulmalik O, Kato GJ. New developments in anti-sickling agents: can drugs directly prevent the polymerization of sickle haemoglobin in vivo? *Br J Haematol.* 2016;175(1):24-30.
64. Kathrein KL, Chari S, Winandy S. Ikaros directly represses the notch target gene Hes1 in a leukemia T cell line: implications for CD4 regulation. *J Biol Chem.* 2008;283(16):10476-84.
65. Chari S, Winandy S. Ikaros regulates Notch target gene expression in developing thymocytes. *J Immunol.* 2008;181(9):6265-74.
66. Kleinmann E, Geimer Le Lay AS, Sellars M, Kastner P, Chan S. Ikaros represses the transcriptional response to Notch signaling in T-cell development. *Mol Cell Biol.* 2008;28(24):7465-75.
67. Ross J, Mavoungou L, Bresnick EH, Milot E. GATA-1 utilizes Ikaros and polycomb repressive complex 2 to suppress Hes1 and to promote erythropoiesis. *Mol Cell Biol.* 2012;32(18):3624-38.
68. Malinge S, Thiollier C, Chlon TM, Dore LC, Diebold L, Bluteau O, et al. Ikaros inhibits megakaryopoiesis through functional interaction with GATA-1 and NOTCH signaling. *Blood.* 2013;121(13):2440-51.

69. Geimer Le Lay AS, Oravecz A, Mastio J, Jung C, Marchal P, Ebel C, et al. The tumor suppressor Ikaros shapes the repertoire of notch target genes in T cells. *Sci Signal*. 2014;7(317):ra28.
70. Lampreia FP, Carmelo JG, Anjos-Afonso F. Notch Signaling in the Regulation of Hematopoietic Stem Cell. *Curr Stem Cell Rep*. 2017;3(3):202-9.
71. Arenzana TL, Schjerven H, Smale ST. Regulation of gene expression dynamics during developmental transitions by the Ikaros transcription factor. *Genes Dev*. 2015;29(17):1801-16.
72. Oravecz A, Apostolov A, Polak K, Jost B, Le Gras S, Chan S, et al. Ikaros mediates gene silencing in T cells through Polycomb repressive complex 2. *Nat Commun*. 2015;6:8823.
73. Wang JH, Nichogiannopoulou A, Wu L, Sun L, Sharpe AH, Bigby M, et al. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity*. 1996;5(6):537-49.
74. ThermoFisher. Illustration of the main steps in PCR-denaturation, annealing, extension-to amplify target sequence from a template DNA. [Available from: <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>].
75. Fellow HKLDMCR, Specialist Registrar in Clinical Genetics D, Maher E. DNA methylation: A form of epigenetic control of gene expression2011. 37-42 p.
76. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*. 2011;25(10):1010-22.
77. Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*. 2013;502(7472):472-9.

78. Ooi SK, Bestor TH. The colorful history of active DNA demethylation. *Cell*. 2008;133(7):1145-8.
79. Wolffe AP, Jones PL, Wade PA. DNA demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(11):5894-6.
80. Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, et al. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nature genetics*. 2003;33(1):61-5.
81. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3):247-57.
82. Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nature Reviews Genetics*. 2017;18:517.
83. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009;324(5929):930-5.
84. Raiber EA, Beraldi D, Martinez Cuesta S, McInroy GR, Kingsbury Z, Becq J, et al. Base resolution maps reveal the importance of 5-hydroxymethylcytosine in a human glioblastoma. *NPJ Genom Med*. 2017;2:6.
85. Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*. 2011;333(6047):1300-3.
86. Tekpli X, Urbanucci A, Hashim A, Vagbo CB, Lyle R, Kringen MK, et al. Changes of 5-hydroxymethylcytosine distribution during myeloid and lymphoid differentiation of CD34+ cells. *Epigenetics Chromatin*. 2016;9:21.

87. Sun W, Zang L, Shu Q, Li X. From development to diseases: the role of 5hmC in brain. *Genomics*. 2014;104(5):347-51.
88. Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, et al. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol*. 2000;10(8):475-8.
89. Smith ZD, Meissner A. The simplest explanation: passive DNA demethylation in PGCs. *EMBO J*. 2013;32(3):318-21.
90. Globisch D, Munzel M, Muller M, Michalakis S, Wagner M, Koch S, et al. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One*. 2010;5(12):e15367.
91. Munzel M, Globisch D, Bruckl T, Wagner M, Welzmueller V, Michalakis S, et al. Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010;49(31):5375-7.
92. Xu Y, Wu F, Tan L, Kong L, Xiong L, Deng J, et al. Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell*. 2011;42(4):451-64.
93. Wu H, D'Alessio AC, Ito S, Wang Z, Cui K, Zhao K, et al. Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Genes Dev*. 2011;25(7):679-84.
94. Seisenberger S, Andrews S, Krueger F, Arand J, Walter J, Santos F, et al. The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol Cell*. 2012;48(6):849-62.

95. Yamaguchi S, Hong K, Liu R, Inoue A, Shen L, Zhang K, et al. Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine during germ cell reprogramming. *Cell Res.* 2013;23(3):329-39.
96. Wu H, Zhang Y. Tet1 and 5-hydroxymethylation: a genome-wide view in mouse embryonic stem cells. *Cell Cycle.* 2011;10(15):2428-36.
97. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature.* 2010;466(7310):1129-33.
98. Madzo J, Liu H, Rodriguez A, Vasanthakumar A, Sundaravel S, Caces DBD, et al. Hydroxymethylation at gene regulatory regions directs stem/early progenitor cell commitment during erythropoiesis. *Cell Rep.* 2014;6(1):231-44.
99. Fujiwara T, O'Geen H, Keles S, Blahnik K, Linnemann AK, Kang YA, et al. Discovering hematopoietic mechanisms through genome-wide analysis of GATA factor chromatin occupancy. *Mol Cell.* 2009;36(4):667-81.
100. Kang YA, Sanalkumar R, O'Geen H, Linnemann AK, Chang CJ, Bouhassira EE, et al. Autophagy driven by a master regulator of hematopoiesis. *Mol Cell Biol.* 2012;32(1):226-39.
101. Tallack MR, Whittington T, Yuen WS, Wainwright EN, Keys JR, Gardiner BB, et al. A global role for KLF1 in erythropoiesis revealed by ChIP-seq in primary erythroid cells. *Genome Res.* 2010;20(8):1052-63.
102. Xu J, Shao Z, Glass K, Bauer DE, Pinello L, Van Handel B, et al. Combinatorial assembly of developmental stage-specific enhancers controls gene expression programs during human erythropoiesis. *Dev Cell.* 2012;23(4):796-811.

103. Boland MJ, Nazor KL, Loring JF. Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation. *Circ Res.* 2014;115(2):311-24.
104. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Ciudad M, Racoeur C, Jooste V, Vey N, et al. TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica.* 2009;94(12):1676-81.
105. Patnaik MM, Lasho TL, Vijayvargiya P, Finke CM, Hanson CA, Ketterling RP, et al. Prognostic interaction between ASXL1 and TET2 mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood Cancer J.* 2016;6:e385.
106. Chou WC, Chou SC, Liu CY, Chen CY, Hou HA, Kuo YY, et al. TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Blood.* 2011;118(14):3803-10.
107. Weissmann S, Alpermann T, Grossmann V, Kowarsch A, Nadarajah N, Eder C, et al. Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2012;26(5):934-42.
108. Zhang TJ, Zhou JD, Yang DQ, Wang YX, Wen XM, Guo H, et al. TET2 expression is a potential prognostic and predictive biomarker in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *J Cell Physiol.* 2018;233(8):5838-46.
109. Haffner MC, Pellakuru LG, Ghosh S, Lotan TL, Nelson WG, De Marzo AM, et al. Tight correlation of 5-hydroxymethylcytosine and Polycomb marks in health and disease. *Cell Cycle.* 2013;12(12):1835-41.
110. Neri F, Incarnato D, Krepelova A, Rapelli S, Pagnani A, Zecchina R, et al. Genome-wide analysis identifies a functional association of Tet1 and Polycomb repressive complex 2 in mouse embryonic stem cells. *Genome Biol.* 2013;14(8):R91.

111. Boeke J, Ammerpohl O, Kegel S, Moehren U, Renkawitz R. The minimal repression domain of MBD2b overlaps with the methyl-CpG-binding domain and binds directly to Sin3A. *J Biol Chem.* 2000;275(45):34963-7.
112. Yildirim O, Li R, Hung JH, Chen PB, Dong X, Ee LS, et al. Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells. *Cell.* 2011;147(7):1498-510.
113. Iurlaro M, Ficiz G, Oxley D, Raiber E-A, Bachman M, Booth MJ, et al. A screen for hydroxymethylcytosine and formylcytosine binding proteins suggests functions in transcription and chromatin regulation. 2013;14(10):R119.
114. Leimeister C, Schumacher N, Steidl C, Gessler M. Analysis of HeyL expression in wild-type and Notch pathway mutant mouse embryos. *Mech Dev.* 2000;98(1-2):175-8.
115. Miao L, Li J, Li J, Tian X, Lu Y, Hu S, et al. Notch signaling regulates Hey2 expression in a spatiotemporal dependent manner during cardiac morphogenesis and trabecular specification. *Sci Rep.* 2018;8(1):2678.
116. Verma N, Pan H, Dore LC, Shukla A, Li QV, Pelham-Webb B, et al. TET proteins safeguard bivalent promoters from de novo methylation in human embryonic stem cells. *Nature genetics.* 2018;50(1):83-95.
117. Kong L, Tan L, Lv R, Shi Z, Xiong L, Wu F, et al. A primary role of TET proteins in establishment and maintenance of De Novo bivalency at CpG islands. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(18):8682-92.
118. Georgopoulos K. The making of a lymphocyte: the choice among disparate cell fates and the IKAROS enigma. *Genes Dev.* 2017;31(5):439-50.

119. Dumortier A, Kirstetter P, Kastner P, Chan S. Ikaros regulates neutrophil differentiation. *Blood*. 2003;101(6):2219-26.
120. Dijon M, Bardin F, Murati A, Batoz M, Chabannon C, Tonnelle C. The role of Ikaros in human erythroid differentiation. *Blood*. 2008;111(3):1138-46.
121. Lopez RA, Schoetz S, DeAngelis K, O'Neill D, Bank A. Multiple hematopoietic defects and delayed globin switching in Ikaros null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(2):602-7.
122. O'Neill DW, Schoetz SS, Lopez RA, Castle M, Rabinowitz L, Shor E, et al. An ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells. *Mol Cell Biol*. 2000;20(20):7572-82.
123. Bank A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. *Blood*. 2006;107(2):435-43.
124. Simon MC, Pevny L, Wiles MV, Keller G, Costantini F, Orkin SH. Rescue of erythroid development in gene targeted GATA-1- mouse embryonic stem cells. *Nature genetics*. 1992;1(2):92-8.
125. Weiss MJ, Yu C, Orkin SH. Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Mol Cell Biol*. 1997;17(3):1642-51.
126. Rylski M, Welch JJ, Chen YY, Letting DL, Diehl JA, Chodosh LA, et al. GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation. *Mol Cell Biol*. 2003;23(14):5031-42.
127. Papetti M, Wontakal SN, Stopka T, Skoultschi AI. GATA-1 directly regulates p21 gene expression during erythroid differentiation. *Cell Cycle*. 2010;9(10):1972-80.

128. Gridley T, Groves AK. Overview of genetic tools and techniques to study Notch signaling in mice. *Methods Mol Biol.* 2014;1187:47-61.
129. Ye Q, Jiang J, Zhan G, Yan W, Huang L, Hu Y, et al. Small molecule activation of NOTCH signaling inhibits acute myeloid leukemia. *Sci Rep.* 2016;6:26510.
130. de Pooter RF, Schmitt TM, de la Pompa JL, Fujiwara Y, Orkin SH, Zuniga-Pflucker JC. Notch signaling requires GATA-2 to inhibit myelopoiesis from embryonic stem cells and primary hemopoietic progenitors. *J Immunol.* 2006;176(9):5267-75.
131. Kutlesa S, Zayas J, Valle A, Levy RB, Jurecic R. T-cell differentiation of multipotent hematopoietic cell line EML in the OP9-DL1 coculture system. *Exp Hematol.* 2009;37(8):909-23.
132. Schmitt TM, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity.* 2002;17(6):749-56.
133. Koipally J, Georgopoulos K. A molecular dissection of the repression circuitry of Ikaros. *J Biol Chem.* 2002;277(31):27697-705.
134. Hahm K, Cobb BS, McCarty AS, Brown KE, Klug CA, Lee R, et al. Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev.* 1998;12(6):782-96.
135. Morgan B, Sun L, Avitahl N, Andrikopoulos K, Ikeda T, Gonzales E, et al. Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *EMBO J.* 1997;16(8):2004-13.
136. Mitchell JL, Seng A, Yankee TM. Expression and splicing of Ikaros family members in murine and human thymocytes. *Mol Immunol.* 2017;87:1-11.

137. Fan Y, Lu D. The Ikaros family of zinc-finger proteins. *Acta Pharm Sin B*. 2016;6(6):513-21.
138. Yatim A, Benne C, Sobhian B, Laurent-Chabalier S, Deas O, Judde JG, et al. NOTCH1 nuclear interactome reveals key regulators of its transcriptional activity and oncogenic function. *Mol Cell*. 2012;48(3):445-58.
139. Wang Y, Zhang H, Chen Y, Sun Y, Yang F, Yu W, et al. LSD1 is a subunit of the NuRD complex and targets the metastasis programs in breast cancer. *Cell*. 2009;138(4):660-72.
140. Nguyen AT, Zhang Y. The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation. *Genes Dev*. 2011;25(13):1345-58.
141. Bottardi S, Mavoungou L, Pak H, Daou S, Bourgoïn V, Lakehal YA, et al. The IKAROS interaction with a complex including chromatin remodeling and transcription elongation activities is required for hematopoiesis. *PLoS Genet*. 2014;10(12):e1004827.
142. Chory EJ, Calarco JP, Hathaway NA, Bell O, Neel D, Crabtree GR. Nucleosome turnover is sufficient to establish varied histone methylation states. 2018:256321.
143. Weishaupt H, Sigvardsson M, Attéma JL. Epigenetic chromatin states uniquely define the developmental plasticity of murine hematopoietic stem cells. *Blood*. 2010;115(2):247-56.
144. Ghosh A, De S, Bell J, Weber B, Wood W, Becker K, et al. Generation and resolution of bivalent chromatin during hematopoiesis (HEM2P.259). 2014;192(1 Supplement):50.4-4.
145. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*. 2006;125(2):315-26.

146. Puri D, Gala H, Mishra R, Dhawan J. High-wire act: the poised genome and cellular memory. *Febs j.* 2015;282(9):1675-91.
147. Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, et al. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev.* 1995;9(8):935-44.
148. Han X, Ranganathan P, Tzimas C, Weaver KL, Jin K, Astudillo L, et al. Notch Represses Transcription by PRC2 Recruitment to the Ternary Complex. *Mol Cancer Res.* 2017;15(9):1173-83.
149. Goardon N, Lambert JA, Rodriguez P, Nissaire P, Herblot S, Thibault P, et al. ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *The EMBO journal.* 2006;25(2):357-66.
150. Itahana Y, Zhang J, Goke J, Vardy LA, Han R, Iwamoto K, et al. Histone modifications and p53 binding poise the p21 promoter for activation in human embryonic stem cells. *Sci Rep.* 2016;6:28112.
151. Zhou B, Wang J, Lee SY, Xiong J, Bhanu N, Guo Q, et al. PRDM16 Suppresses MLL1r Leukemia via Intrinsic Histone Methyltransferase Activity. *Molecular cell.* 2016;62(2):222-36.
152. Yoshida T, Hazan I, Zhang J, Ng SY, Naito T, Snippert HJ, et al. The role of the chromatin remodeler Mi-2beta in hematopoietic stem cell self-renewal and multilineage differentiation. *Genes Dev.* 2008;22(9):1174-89.
153. Tee WW, Reinberg D. Chromatin features and the epigenetic regulation of pluripotency states in ESCs. *Development.* 2014;141(12):2376-90.

154. Tee WW, Shen SS, Oksuz O, Narendra V, Reinberg D. Erk1/2 activity promotes chromatin features and RNAPII phosphorylation at developmental promoters in mouse ESCs. *Cell*. 2014;156(4):678-90.
155. Xie W, Ling T, Zhou Y, Feng W, Zhu Q, Stunnenberg HG, et al. The chromatin remodeling complex NuRD establishes the poised state of rRNA genes characterized by bivalent histone modifications and altered nucleosome positions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(21):8161-6.
156. Su J, Wang Y, Xing X, Liu J, Zhang Y. Genome-wide analysis of DNA methylation in bovine placentas. *BMC Genomics*. 2014;15:12.
157. Xia L, Huang W, Bellani M, Seidman MM, Wu K, Fan D, et al. CHD4 Has Oncogenic Functions in Initiating and Maintaining Epigenetic Suppression of Multiple Tumor Suppressor Genes. *Cancer Cell*. 2017;31(5):653-68 e7.
158. Zhu F, Zhu Q, Ye D, Zhang Q, Yang Y, Guo X, et al. Sin3a-Tet1 interaction activates gene transcription and is required for embryonic stem cell pluripotency. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(12):6026-40.
159. Zeng Y, Yao B, Shin J, Lin L, Kim N, Song Q, et al. Lin28A Binds Active Promoters and Recruits Tet1 to Regulate Gene Expression. *Mol Cell*. 2016;61(1):153-60.
160. Ishiko E, Matsumura I, Ezoe S, Gale K, Ishiko J, Satoh Y, et al. Notch signals inhibit the development of erythroid/megakaryocytic cells by suppressing GATA-1 activity through the induction of HES1. *J Biol Chem*. 2005;280(6):4929-39.
161. Mullican SE, Zhang S, Konopleva M, Ruvolo V, Andreeff M, Milbrandt J, et al. Abrogation of nuclear receptors Nr4a3 and Nr4a1 leads to development of acute myeloid leukemia. *Nat Med*. 2007;13(6):730-5.

162. Ramirez-Herrick AM, Mullican SE, Sheehan AM, Conneely OM. Reduced NR4A gene dosage leads to mixed myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms in mice. *Blood*. 2011;117(9):2681-90.
163. Chen MT, Dong L, Zhang XH, Yin XL, Ning HM, Shen C, et al. ZFP36L1 promotes monocyte/macrophage differentiation by repressing CDK6. *Sci Rep*. 2015;5:16229.
164. Wang Z, Liu Z, Wu X, Chu S, Wang J, Yuan H, et al. ATRA-induced cellular differentiation and CD38 expression inhibits acquisition of BCR-ABL mutations for CML acquired resistance. *PLoS Genet*. 2014;10(6):e1004414.
165. Willer A, Jakobsen JS, Ohlsson E, Rapin N, Waage J, Billing M, et al. TGIF1 is a negative regulator of MLL-rearranged acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29(5):1018-31.
166. Park JI, Jeong JS, Han JY, Kim DI, Gao YH, Park SC, et al. Hydroxyurea induces a senescence-like change of K562 human erythroleukemia cell. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2000;126(8):455-60.
167. Drullion C, Tregoeat C, Lagarde V, Tan S, Gioia R, Priault M, et al. Apoptosis and autophagy have opposite roles on imatinib-induced K562 leukemia cell senescence. *Cell Death Dis*. 2012;3:e373.
168. Mercher T, Cornejo MG, Sears C, Kindler T, Moore SA, Maillard I, et al. Notch signaling specifies megakaryocyte development from hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):314-26.
169. Kohyama M, Ise W, Edelson BT, Wilker PR, Hildner K, Mejia C, et al. Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature*. 2009;457(7227):318-21.

170. Vossenaar ER, Radstake TR, van der Heijden A, van Mansum MA, Dieteren C, de Rooij DJ, et al. Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis*. 2004;63(4):373-81.
171. Yu H, Neale G, Zhang H, Lee HM, Ma Z, Zhou S, et al. Downregulation of Prdm16 mRNA is a specific antileukemic mechanism during HOXB4-mediated HSC expansion in vivo. *Blood*. 2014;124(11):1737-47.
172. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JPt, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004;306(5694):269-71.
173. Aster JC, Pear WS, Blacklow SC. Notch signaling in leukemia. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:587-613.
174. Dumortier A, Jeannet R, Kirstetter P, Kleinmann E, Sellars M, dos Santos NR, et al. Notch activation is an early and critical event during T-Cell leukemogenesis in Ikaros-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 2006;26(1):209-20.
175. Kannan S, Sutphin RM, Hall MG, Golfman LS, Fang W, Nolo RM, et al. Notch activation inhibits AML growth and survival: a potential therapeutic approach. *J Exp Med*. 2013;210(2):321-37.
176. Capparelli C, Chiavarina B, Whitaker-Menezes D, Pestell TG, Pestell RG, Hult J, et al. CDK inhibitors (p16/p19/p21) induce senescence and autophagy in cancer-associated fibroblasts, "fueling" tumor growth via paracrine interactions, without an increase in neo-angiogenesis. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2012;11(19):3599-610.

177. Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulić V. Differential Roles for Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p21 and p16 in the Mechanisms of Senescence and Differentiation in Human Fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*. 1999;19(3):2109.

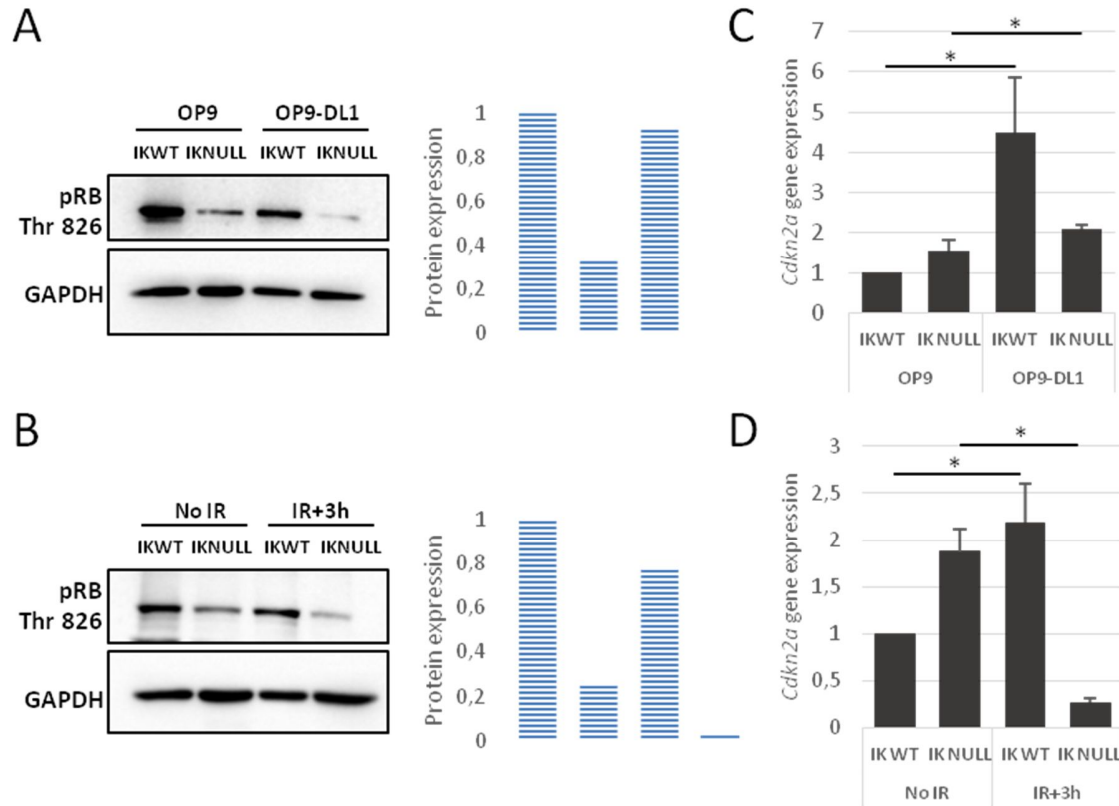
Annexe I : Détermination des effets biologiques dus à la mutation d'IKAROS et l'activation ectopique de la voie NOTCH.

Suite à l'article "IKAROS is required for proper expression of NOTCH target genes upon external signaling", nous avons réalisé d'autres expériences pertinentes relatives aux effets biologiques pouvant être attribués à l'activité de $P21^{WAF1/CIP1}$. Ces résultats n'ont pas été inclus dans l'article puisqu'il manque certaines expériences complémentaires afin d'attribuer une valeur biologique significative à ces résultats. D'après la littérature, l'augmentation d'expression de $P21^{WAF1/CIP1}$ peut avoir un effet anti-tumoral important, dû entre autres à ses effets biologiques sur l'apoptose, le cycle cellulaire (prolifération des cellules) et la sénescence. Nous avons dans un premier temps orienté notre étude sur la sénescence.

La sénescence est due à un arrêt persistant en G1 du cycle cellulaire et causée par l'inactivation des complexes Cdk-cycline de la phase G1, responsables de la phosphorylation de la protéine rétinoblastome (pRB). $P21^{WAF1/CIP1}$ fait partie des protéines responsables de l'inactivation de ces complexes et est retrouvée surexprimée dans les cellules sénescents (176, 177). $P21^{WAF1/CIP1}$ est décrite comme une protéine initiateur de la sénescence alors que la protéine $P16^{INK4}$ est reconnue pour maintenir ce phénotype (177). Nous avons dans un premier temps vérifié si la sénescence était induite dans notre système de culture (Ik^{WT} et Ik^{NULL} en co-culture avec OP9 ou OP9-DL1) et dans un système contrôle dans lequel les cellules ont été exposées à un stress cellulaire comme l'irradiation (3.5 Gy et récolte des cellules après 3 heures). Les cellules sénescents ont la particularité de ne pouvoir phosphoryler la protéine pRB ; on observe donc dans ces cellules une hypophosphorylation prononcée de cette protéine. Le niveau de phosphoryla-

tion, évalué dans les deux systèmes de culture (Annexe IA et IB), montre que les cellules mutées pour *Ikzf1* sont d'autant plus sénescents quand P21^{WAF1/CIP1} est surexprimé (quand NOTCH est activé (Figure 3B du manuscrit d'article I "IKAROS is required for proper expression of NOTCH target genes upon external signaling ") ou quand les cellules sont irradiées (Figure 8A du manuscrit d'article I "IKAROS is required for proper expression of NOTCH target genes upon external signaling")). Pour vérifier si l'hypophosphorylation observée n'est pas due à une surexpression de la protéine P16^{INK4}, nous avons déterminé l'expression du gène *Cdkn2a* (encodant pour la protéine P16^{INK4}) dans les deux systèmes de culture (Annexe IC et ID). De façon intéressante, l'expression du gène *Cdkn2a* dans les cellules exposées à l'activation de NOTCH ou à l'irradiation diminue significativement alors que l'expression de *Cdkn1a* augmente significativement. Il semble donc que les cellules mutées pour *Ikzf1* et induites par un stress comme l'activation de la voie NOTCH ou des rayons ionisants sont plus susceptibles de rentrer en sénescence. Cependant, des résultats complémentaires doivent être apportés pour vérifier si la diminution de *Cdkn2a* n'est pas due à une sénescence réversible.

Note : la légende de l'Annexe I est en anglais puisqu'elle vient compléter les figures de l'article I ("IKAROS is required for proper expression of NOTCH target genes upon external signaling"). L'Annexe I introduit les premières expériences qui permettront, à terme, de caractériser le comportement biologique observé suite à l'invalidation du facteur IKAROS et l'activation ectopique de la voie NOTCH. Les expériences complétées pourront donc être, à terme, incluses dans l'article à soumettre.



Annexe I. Biological effect of IKAROS mutation and NOTCH activation. Ik^{WT} and Ik^{NULL} fetal liver harvested either after 48 hours culture on OP9 or OP9-DL1 cells (A;C) or after 3 hours post-irradiation (IR; 3.5Gy) (B;D). In panels A-B, western blot analysis of phosphorylated pRB Threonine 826 (pRB Thr826) and GAPDH (control) with pRB Thr826 relative protein level calculated when compared to GAPDH (blue columns). In panels C-D, relative expression of *Cdkn2a* (which encodes for P16^{INK4} protein) measured by RT-qPCR. The relative expression was calculated according to the control condition Ik^{WT}-OP9 (C) or Ik^{WT}-No IR (D) and using *Hprt* as the internal control (*: $p \leq 0.05$ by Student's t test (n=3)).

Annexe II. Implication du facteur IKAROS dans le recrutement du PRC2 et de son activité associée dans la lignée cellulaire humaine K562.

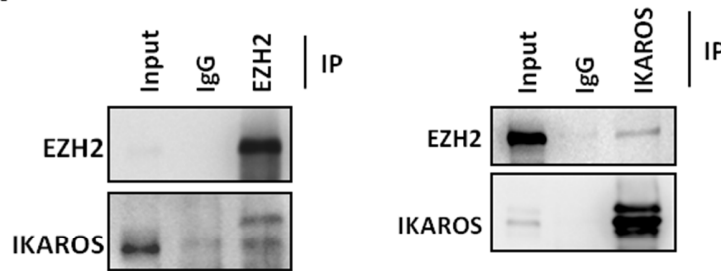
Les résultats obtenus dans le manuscrit de l'article I "IKAROS is required for proper expression of NOTCH target genes upon external signaling" démontrent que l'absence du facteur IKAROS influe sur le recrutement du PRC2 au TSS et ORF du gène *Cdkn1a*. Dans la littérature, IKAROS fut déjà décrit chez la souris comme responsable du recrutement du PRC2 dans les cellules érythroïdes (gène *Hes1*) (67) et dans les thymocytes (plus de 500 gènes développementaux) (72). Pour renforcer l'idée qu'IKAROS puisse utiliser cette fonction de façon plus générale dans les cellules, nous avons étudié la relation IKAROS-PRC2 dans une lignée cellulaire humaine myélo-érythroïde, K562. Cette lignée provient d'un patient atteint de leucémie myéloïde chronique, caractérisée par la fusion BCR-ABL. Cette lignée est communément utilisée pour mieux appréhender le développement de cette maladie en testant de nombreuses molécules à activité anti-tumorale et capables de passer outre la résistance souvent observée chez les patients traités.

Dans un premier temps, l'interaction directe et réciproque entre IKAROS et le PRC2 a été vérifiée par immunoprécipitation dans les K562 (Annexe IIA).

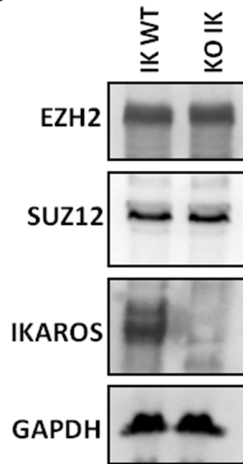
Ensuite, nous avons éteint l'expression du facteur IKAROS dans les cellules K562 (Annexe IIB) par la méthode CRISPR, afin d'étudier sa relation avec le complexe PRC2 (composé des sous-unités EZH2, SUZ12 et EED). EZH2, sous-unité catalytique, est souvent choisie pour représenter le complexe. Cependant, étant donné que l'anticorps anti-EZH2 utilisé ne fonctionne pas de façon optimale dans les expériences de ChIP, nous avons utilisé son

partenaire SUZ12. Afin de vérifier si l'expression de la protéine SUZ12 est semblable à son partenaire EZH2, nous avons réalisé un immunobuvardage de type « western blot » dans les K562 Ik^{WT} et dans les K562 dont l'expression d'IKAROS est éteinte (KO IK) (Annexe IIB). L'expression des protéines EZH2 et SUZ12 est semblable et ne semble pas être influencée par la perte d'IKAROS. Nous avons donc utilisé l'anticorps anti-SUZ12 pour déterminer si IKAROS pouvait être responsable du recrutement du complexe PRC2 dans les K562. Pour cela, nous avons utilisé le gène *Il17rd*, dont l'ORF est enrichi à la fois par IKAROS et par H3K27me3, marque spécifique déposée par le PRC2. De façon intéressante, l'absence du facteur IKAROS entraîne une diminution significative du dépôt de SUZ12 dans l'ORF du gène *Il17rd*. Pour vérifier si cette diminution impacte l'activité globale du complexe PRC2, nous avons vérifié les niveaux d'enrichissement de H3K27me3, marque qui témoigne de l'activité du PRC2. En absence d'IKAROS, la diminution observée pour SUZ12 corrèle bien avec une diminution significative de l'activité du complexe PRC2 dans les cellules K562.

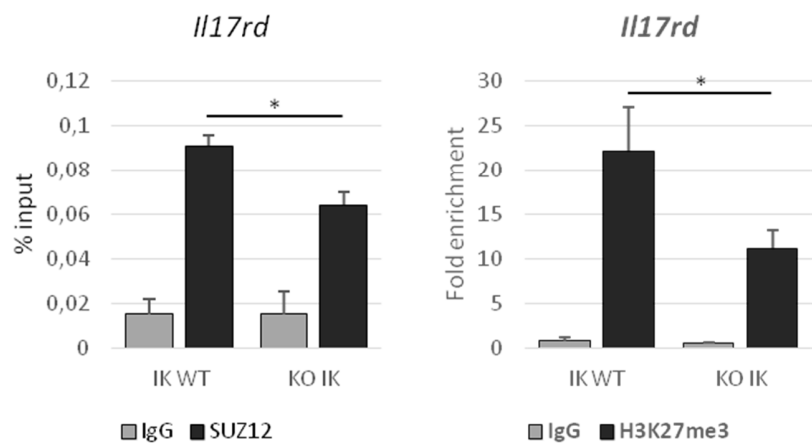
A



B



C



Annexe II. Implication du facteur IKAROS dans le recrutement du PRC2 et de son activité associée dans la lignée cellulaire humaine K562. (A) Immunoprécipitation de la protéine EZH2 et de son contrôle isotypique (immunoglobuline de type ‘rabbit’) dans les cellules K562 WT, associée à la détection de la protéine IKAROS. Le panel de droite représente l’immunoprécipitation inverse, réalisée avec la protéine IKAROS et la détection de la protéine EZH2. (B ;C) Utilisation des cellules K562 IKAROS WT (IK WT) et K562 invalidées pour IKAROS (KO IK) pour (B) la détection des niveaux protéiques de EZH2, SUZ12, IKAROS et GAPDH (contrôle) par immunobuvardage de type Western et (C) détecter l’enrichissement de la protéine SUZ12 (en ‘% input’) et de H3K27me3 (en ‘Fold enrichment’) dans l’ORF du gène *Ill17rd* par expérience de ChIP. Le contrôle interne utilisé pour SU

Z12 est le promoteur du gène *Thp1* tandis que le TSS du gène *Parp1* a été utilisé pour H3K27me3. Les valeurs de l'axe vertical représentent l'enrichissement relatif par rapport au contrôle interne. n=3 avec p-value<0.05.

